



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
PIANO TRIENNALE 2006-2008**

Progetti di ricerca

Vol. 2

Istituto Superiore di Sanità

Istituto Superiore di Sanità. Piano triennale 2006-2008. Progetti di ricerca. Vol. 2.

2006, ii, 812 p.

Il presente Piano Triennale 2006-2008 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 (2003-2005). Il secondo volume presenta le linee di ricerca e le attività di controllo previste per il triennio 2006-2008 suddivise per Dipartimenti, Centri e Servizi. Il terzo volume riporta in elenco alfabetico le pubblicazioni dei ricercatori dell'ISS prodotte nel triennio 2003-2005.

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

Istituto Superiore di Sanità

Istituto Superiore di Sanità. Three Year Plan 2006-2008. Research projects. Vol. 2.

2006, ii, 812 p. (in Italian)

This Three Year Plan 2006-2008 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 (2003-2005). The second volume offers the research programmes and the control activity for 2006-2008 divided into Departments, Centres and Services. The third volume contains the alphabetical list of the bibliographic references of the publications of ISS scientists in 2003-2005.

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.

INDICE

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria	
Attività di ricerca	1
Attività di controllo, valutazione, parere	61
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze	
Attività di ricerca	79
Attività di controllo, valutazione, parere	155
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare	
Attività di ricerca	163
Attività di controllo, valutazione, parere	197
Dipartimento del Farmaco	
Attività di ricerca	201
Attività di controllo, valutazione, parere	275
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate	
Attività di ricerca	281
Attività di controllo, valutazione, parere	399
Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale	
Attività di ricerca	413
Attività di valutazione, controllo, parere	443
Dipartimento di Tecnologie e Salute	
Attività di ricerca	451
Attività di valutazione, controllo, parere	519
Centro Nazionale AIDS per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS	
Attività di ricerca	535
Attività di controllo, valutazione, parere	575
Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute	
Attività di ricerca	579
Attività di controllo, valutazione, parere	663
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentare	
Attività di ricerca	677
Attività di controllo, valutazione, parere	735

Centro Nazionale Trapianti	
Attività di ricerca	743
Attività di controllo, valutazione, parere	747
Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale	
Attività di ricerca	757
Attività di controllo, valutazione, parere	763
Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca e Attività Editoriali	
Attività di ricerca	771
Attività di controllo, valutazione, parere	783
Ufficio per le Relazioni Esterne	
Attività di ricerca	787

**Dipartimento
Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria**

Attività di ricerca

Prevalidation of in vitro models for the prediction of gastrointestinal absorption. Study Contract CCR.IHCP.C431224.X0

Il progetto si pone come obiettivo la valutazione della riproducibilità (intra- e tra laboratori) e della capacità predittiva (sensibilità, specificità, concordanza) di un modello in vitro di barriera intestinale, atto a stimare l'assorbimento orale e la biodisponibilità di sostanze chimiche significative dal punto di vista dell'esposizione umana.

Risultati attesi nel triennio

Avviare l'iter di validazione di un modello intestinale *in vitro* che possa essere utilizzato per predire la biodisponibilità di sostanze chimiche a livello dell'apparato gastrointestinale, consentendo l'acquisizione di elementi utili alla valutazione del rischio connesso con l'esposizione orale umana a contaminanti chimici.

Trasferibilità dei risultati

Acquisizione di un modello intestinale *in vitro* atto a predire il rischio connesso con l'esposizione umana per via orale, a sostanze chimiche di natura diversa.

Strategie e indicatori innovativi per la valutazione gene-ambiente nei tumori polmonari professionali

Il Progetto vede impegnate 11 unità operative, con professionalità e finalità diverse che svolgeranno studi sperimentali, clinici e epidemiologici. La UO ISS ha l'obiettivo di fornire indicazioni per l'identificazione di eventuali fattori metabolici di suscettibilità individuale e sul meccanismo di azione di agenti eziologici per il tumore del polmone. Particolare attenzione verrà riservata ai polimorfismi di enzimi della bioattivazione dei cancerogeni oggetto di studio (CYP1A1 per gli IPA e CYP2A6 per la micotina) e della loro detossificazione (GST M eT, coinvolte anche nella detossificazione di prodotti dello stress ossidativo). I biomarcatori così identificati, una volta validati in successivi studi clinici e epidemiologici potranno essere applicati per la diagnosi molecolare di neoplasie polmonari e utilizzati per l'identificazione di gruppi di popolazione a maggior rischio di sviluppare la patologia polmonare.

Risultati attesi nel triennio

I risultati della UO ISS contribuiranno insieme a quelli di altre unità operative a 1) chiarire i meccanismi di azione di cancerogeni presenti in ambienti di lavoro caratterizzati da un rischio specifico di esposizione e 2) identificare il ruolo dei polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione nella variabilità individuale della risposta all'esposizione ad agenti cancerogeni.

Trasferibilità dei risultati

Il Progetto nella sua interezza si propone di trasferire al SSN risultati riguardanti la tematica del tumore al polmone di grande impatto sulla sanità pubblica attraverso:

contributo alla comprensione dei meccanismi di azione di agenti eziologici presenti in ambienti lavorativi a rischio

verifica della interazione tra genotipi suscettibili e cancerogeni;

caratterizzazione dell'esposizione attraverso l'uso di nuovi indicatori per esposizioni occupazionali in settori produttivi a rischio;

contributo alla stima della frazione eziologica professionale e alla definizione di fattori di rischio genetici utili alla messa a punto di strategie preventive nei confronti del tumore a maggiore incidenza e mortalità nel Paese

Stato delle conoscenze delle acque superficiali del Parco Regionale dell'Appia Antica

L'analisi integrata del territorio permette di valutarne lo stato dell'arte in termini di inquinamento e di qualità ecosistemica, come punto di partenza per procedere poi verso un'adeguata pianificazione degli interventi e gestione del territorio e di conseguenza ridurre i potenziali fattori di rischio per gli ecosistemi e per la salute delle popolazioni esposte. In sintesi si riassumono gli obiettivi principali del presente progetto

Perfezionamento delle procedure d'indagine per l'individuazione della compromissione reversibile o irreversibile della risorsa attraverso lo studio e il monitoraggio delle capacità di adattamento degli ecosistemi considerati agli stress ambientali;

Individuazione delle correlazioni funzionali tra salute/benessere collettivo e mantenimento della risorsa con particolare riferimento all'uso irriguo e potabile e al rischio d'inondazione.

Il raggiungimento degli obiettivi passerà attraverso la messa a punto di nuovi indicatori, e l'utilizzo di quelli standardizzati che permettano di valutare il grado di compromissione della risorsa, di metodiche analitiche e tecniche di riqualificazione dell'ecosistema a scala di bacino idrografico. Le nuove strategie di gestione integrata dei bacini idrografici consentiranno l'ottenimento di un bilancio sostenibile tra necessità umane (sociali e economiche), e quelle di tutela della salute e del benessere collettivo derivante dalla conservazione dei sistemi naturali, anche al fine di renderne duratura la possibilità di fruizione da parte delle generazioni future.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione degli effetti spazio-temporali sugli ecosistemi e sulle popolazioni umane esposte.

Ricadute applicative rivolte alla gestione sostenibile degli ecosistemi di acqua corrente anche attraverso norme legislative. Identificazione dei fattori di vulnerabilità alla esposizione delle comunità animali e vegetali alle pressioni

Pubblicazioni scientifiche riguardanti metodi innovativi e tarati per le realtà biogeografiche indagate anche attraverso metodologie con approcci interdisciplinari.

Potranno essere evidenziate le correlazioni tra la compromissione della risorsa e i suoi effetti sulla salute delle popolazioni umane. Si potranno conoscere, inoltre, quali aree geografiche dispongono di informazioni integrate o simultanee concernenti l'uomo e l'ambiente.

Trasferibilità dei risultati

Linee guida, pubblicazioni, rapporti tecnici.

Messa punto di uno strumento conoscitivo per la gestione delle acque superficiali della provincia di Viterbo

Verrà predisposto uno schema dei dati raccolti e di supporti informatici utili alla messa punto del programma; definito il modello da utilizzare confrontato con altre metodiche disponibili. Verrà delineato un sistema che permetterà l'analisi dei fattori di pressione a scala di bacino idrografico e la loro correlazione con gli indicatori di stato ambientali al fine di ottenere uno strumento utile alla definizione di politiche di intervento nell'ambito della sostenibilità e del risanamento ambientale per la riduzione dei fenomeni di eutrofizzazione sulle acque superficiali della Provincia.

Risultati attesi nel triennio

Supporto al processo di *Decision-making* degli organismi preposti alla gestione delle acque superficiali della Provincia al fine di ottimizzare la gestione e il risanamento delle acque superficiali per la prevenzione di fenomeni eutrofici

Trasferibilità dei risultati

Linee guida, pubblicazioni, rapporti tecnici, nuove metodiche per definire lo stato e per la gestione delle acque superficiali.

Programma per la valutazione dell'impatto dello scarico di acque reflue industriali del centro ricerche ENEA-Casaccia sullo stato ecologico del corpo idrico recettore fosso della Casaccia

Nell'ambito dell'accordo di collaborazione con l'ENEA il nostro laboratorio sarà impegnato in uno studio degli ecosistemi acquatici strettamente interconnessi con il refluo liquido proveniente da un impianto di trattamento di rifiuti radioattivi. Il refluo dovrà essere immesso nel corpo idrico recettore previo trattamento depurativo e dovrà rispettare i parametri di legge (DL.vo 152/99 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.

Risultati attesi nel triennio

Gestione dei reflui e metodiche di riduzione degli impatti sugli ecosistemi.

Trasferibilità dei risultati

Metodologie, linee guida, pubblicazioni.

Studio microanalitico delle concentrazioni di elementi in traccia su materiale cerebrale autoptico proveniente da parkinsoniani

La patogenesi del Morbo di Parkinson (MP) di tipo sporadico non è ancora completamente chiarita. Numerosi dati clinici e sperimentali suggeriscono che alcuni metalli - quale Fe, Cu, Mn, ecc. - in stato *redox* attivo, possano promuovere la formazione di radicali liberi, che a loro volta possono condurre ad un danno cellulare cumulativo. Tali elementi, sebbene siano in parte essenziali per il normale funzionamento delle cellule nervose e gliali, condividono alcuni meccanismi di trasporto e una selettiva azione neurotossica a carico dei gangli della base. Quale possa essere la causa della trasformazione di elementi fisiologici in agenti neurotossici durante i processi di invecchiamento dell'individuo non è ancora del tutto chiaro. È stato recentemente ipotizzato che l'assunzione cronica anche a basse dosi di alcuni elementi chimici contaminanti quali Be, Cd, Co, Cr, Mo, Ni e V possa interferire con i livelli di Fe intracellulare nella sostanza nera determinandone concentrazioni tossiche.

La verifica di tale ipotesi può essere valutata attraverso diverse vie sperimentali, per esempio, attraverso la quantificazione sistematica dei livelli dei suddetti oligoelementi nel sangue, nel *liquor* cerebrospinale e nelle urine di popolazioni omogenee di soggetti normali e affetti da MP. Una linea di studio in tal senso è stata intrapresa anche in ISS e è in fase di valutazione. In questo progetto si intende condurre uno studio autoptico e microanalitico delle concentrazioni relative dei suddetti elementi a livello delle cellule selettivamente vulnerabili della sostanza nera. Lo studio sarà condotto su circa 10 pazienti affetti da MP e includerà un egual numero di casi-controllo. Sarà effettuato su materiale congelato immediatamente dopo l'autopsia, ponendo molta cura ad evitare contaminazioni ambientali dei campioni durante il prelievo, la conservazione e le procedure analitiche.

Risultati attesi nel triennio

Verifica di eventuali alterazioni del profilo elementare nel tessuto cerebrale coinvolto nella neurodegenerazione parkinsoniana, con particolare riguardo al tessuto della sostanza nera.

Trasferibilità dei risultati

Gli eventuali sbilanci del quadro degli elementi potrà essere la base per ulteriori approfondimenti su quegli elementi che risulteranno significativamente diversi tra pazienti e controlli.

Valore predittivo delle alterazioni del quadro elementare e dello stress ossidativo nel tumore del colon-retto

La verifica dell'associazione tra contenuto ematico di elementi chimici, danno ossidativo e malattia si attuerà esaminando due gruppi di pazienti e in un gruppo di controllo sano.

Nel primo confluiranno i pazienti affetti da poliposi del colon, con funzione di controllo a tempo 0, essendo la poliposi uno dei fattori di maggior rischio per lo sviluppo del cancro al colon-retto (CCR). Nel secondo gruppo ci saranno i pazienti con CCR confermato da esame istologico. In questo gruppo verrà considerato, dopo l'intervento, il grado d'infiltrazione del tumore per evidenziare un'eventuale alterazione del profilo dei metalli in funzione della gravità della patologia. In questi pazienti CCR si procederà ad una stadiazione completa attraverso la valutazione degli onco-marker e con una TAC tb. Tutti i pazienti eseguiranno oltre agli usuali esami (EGC, una Rx del torace e una *routine* ematica completa) anche accertamenti atti ad evidenziare lo stadio della malattia (ecografia epatica, Rx clisma opaco, EGA, PFR, protidogramma). Ogni gruppo consisterà di circa 100 pazienti. Il gruppo di controllo sarà costituito da 100 donatori di sangue nei quali esami diagnostici specifici escludano patologie neoplastiche.

Lo studio multicentrico mira a favorire, su un obiettivo coordinato, l'aggregazione di competenze diverse, operative negli specifici settori del biomonitoraggio, della tossicologia, della clinica e chirurgia oncologica e dell'epidemiologia. Attraverso un approccio multidisciplinare si tenta, quindi, di acquisire conoscenze sull'interazione eziopatogenetica tra fattori biologici e ambientali e di dare un significato predittivo di CCR ad alterazioni del profilo elementare e/o dello stato ossidativo.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto intende valutare il potere predittivo dell'eventuale alterazione del contenuto ematico di circa 20 elementi chimici e dei parametri dello stress ossidativo nell'insorgenza del cancro al colon-retto (CCR). L'ipotesi che si vuole verificare è l'esistenza di un set di variabili (elementi chimici, parametri dello *stress* ossidativo, ecc.) capace di discriminare tra il gruppo di pazienti affetti da tumore (adenocarcinoma confermato) e i gruppi di controllo.

Obiettivi secondari sono:

verificare l'esistenza di alterazioni del profilo elementare tra pazienti affetti da poliposi e pazienti (controllo al tempo 0) con adenocarcinoma a diversa stadiazione con l'intento di individuare variazioni in funzione della gravità della malattia;

valutazione dell'interazione tra esposizione cronica ambientale/alimentare e suscettibilità biologica attraverso lo studio di sotto-gruppi di popolazione patologica in funzione degli onco-marker riscontrati.

Il progetto ha comunque, come obiettivo ultimo, l'incremento delle conoscenze sugli eventuali effetti di cofattori ambientali (esposizioni prolungate anche a basse dosi ad alcuni elementi) sulla patogenesi di malattie tumorali quali l'adenocarcinoma del colon-retto con un approccio statistico-epidemiologico, che può rappresentare la base cognitiva di partenza per ulteriori sviluppi sperimentali.

Trasferibilità dei risultati

Individuazione di possibili *marker* del CCR da utilizzare nell'azione di prevenzione del CCR.

Biomonitoraggio della popolazione: definizione dei Valori di Riferimento per gli elementi chimici

Il progetto prevede la raccolta di fluidi biologici da sotto-gruppi di popolazione selezionati in base allo stato di salute generale, al tipo di residenza (rurale/urbana), all'età (20-40, 40-65 e oltre 65 anni) e al genere. A tal fine viene utilizzato un questionario *standard* informatizzato sul quale sono raccolte le informazioni necessarie: abitudini di vita (ad es., attività fisica, fumo), abitudini alimentari (ad es., dieta mista o vegetariana, consumo di pesce, di alcool, caffè, ecc.), uso di medicinali e/o integratori minerali, eventuale acclarata esposizione di tipo ambientale (traffico, vicinanza a inceneritori, industrie, ecc.) o occupazionale agli elementi. L'anamnesi permette la selezione dei partecipanti in modo da ottenere sotto-gruppi di riferimento omogenei di circa 150 soggetti ognuno, numero sufficiente per una trattazione statistica adeguata.

Queste attività preveranno nel prossimo triennio, la prosecuzione e il completamento del monitoraggio della popolazione generale "sana" urbana (di Roma, Pavia, e altre città), semi-urbana (città a limitato traffico veicolare, come ad esempio, Novafeltria), rurale e pesantemente esposta al traffico veicolare (addetti alla guida dei tram di Roma), attraverso la definizione in matrice ematica (siero e sangue), in urina e capelli dei livelli di elementi di interesse tossicologico-ambientale, quali Al, Be, B, Hg, Mn, Te, V, ecc. È previsto anche lo studio dell'esposizione della popolazione generale come conseguenza della presenza di amalgami e/o protesi odontoiatriche.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto intende conseguire i seguenti obiettivi:

monitoraggio biologico della popolazione generale per la valutazione dell'esposizione ad elementi chimici di interesse tossicologico-ambientale;

accertamento dei Valori di Riferimento (VR) per diversi elementi chimici in fluidi e campioni biotipici;

approntamento dell'Atlante dei VR della popolazione italiana;

validazione dell'informazione sperimentale e sviluppo metodologico per la determinazione del contenuto totale degli elementi in fluidi biologici e tessuti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati finali saranno divulgati in sede nazionale e internazionale anche attraverso la realizzazione di un Atlante dei Valori di Riferimento della popolazione italiana. Il confronto di tali dati con quelli di altri gruppi di popolazione potrà far individuare possibili esposizioni anomale e essere un valido contributo per la definizione del rischio della popolazione italiana.

Ruolo degli elementi neurotossici nella eziopatologia delle malattie neurodegenerative

Il progetto continua ricerche precedentemente avviate sugli effetti di cofattori ambientali – in questo caso l'esposizione prolungata anche a basse dosi ad alcuni elementi chimici – sull'insorgenza di malattie neurodegenerative (malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson e Sclerosi multipla). Lo schema sperimentale rimane quello di monitorare per gli elementi chimici e per i parametri del danno ossidativo fluidi biologici di sottogruppi di popolazioni patologiche e valutarne le eventuali alterazioni per confronto con sottogruppi di individui non patologici.

Nel prossimo triennio le attività prevedono la prosecuzione e completamento del monitoraggio della popolazione patologica per gli elementi neurotossici in matrici di siero,

sangue, urina, *liquor* e capelli, al fine di raggiungere una casistica adeguata per dare una significatività statistica ai risultati ottenuti in un primo limitato gruppo di pazienti (risultati oggetto di *report* già disponibili).

Inoltre sarà oggetto di particolare attenzione l'identificazione di possibili interazioni tra suscettibilità individuali e esposizioni a neurotossici ambientali attraverso lo studio di sottogruppi di gemelli mono e dizigoti discordanti per malattia (nel caso di sclerosi multipla). A tutti i pazienti e controlli saranno anche definito lo stato ossidativo individuale, in termini di capacità di difesa contro i radicali liberi e danno ossidativo derivante da specie dell'ossigeno e dell'ossido nitrico.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione del contenuto di elementi neurotossici nei fluidi di soggetti sani e malati, indispensabile per chiarire l'alterazione del profilo elementare in funzione del tipo e dell'attività della malattia.

Definizione dell'eventuale ruolo predittivo di alcuni elementi chimici e dei parametri del danno ossidativo nell'insorgenza del morbo di Alzheimer e di Parkinson e della Sclerosi Multipla.

Individuazione di alterazioni del quadro elementare che possa essere associato alle patologie in esame anche ad uno stadio precoce.

Trasferibilità dei risultati

Proposta di eventuali linee guida che contemplino il monitoraggio del danno ossidativo e degli elementi chimici che si troveranno implicati nella eziogenesi dei danni neurodegenerativi considerati.

I risultati finali saranno verificati anche attraverso la loro divulgazione in sede nazionale e internazionale.

Studio dei meccanismi patogenetici e teratogeni dovuti all'esposizione all'etanolo da solo e in sinergia con altri contaminanti ambientali: strategie per un intervento integrato

Gli studi sugli effetti sinergici di alcol e tossici ambientali sono ad oggi scarsi e legati a problematiche particolari come, ad esempio, gli studi di autori russi sugli effetti dell'abuso di alcol in popolazioni già esposte a situazioni ecologicamente molto sfavorevoli. Data l'estrema complessità del problema alcol e delle sue implicazioni in ambito di salute pubblica, la progettazione e realizzazione di studi collaborativi multidisciplinari costituisce insostituibile strumento per la conoscenza dei meccanismi patogenetici e per la valutazione dell'impatto tossicologico dovuto all'abuso di alcol e all'esposizione a contaminanti anche a fini di prevenzione. L'approccio del progetto è basato sull'evidenza scientifica e sull'utilizzo ad ampio raggio di esperienze scientifiche di alto livello quali sono quelle maturate nell'ambito delle attività dei contraenti l'accordo. Le competenze richieste vanno dalla chimica, biochimica, immunologia alla clinica, genetica, scienze comportamentali. Sono coinvolti esperti dell'ISS del dipartimento AMPP e in dipartimenti diversi, e del Centro di Riferimento Alcolologico. In considerazione dei problemi alcolologici e ambientali emergenti in ambito nazionale e internazionale, particolare attenzione viene posta alle tematiche relative alla salute della donna e del bambino, soggetti biologicamente più vulnerabili al danno organico, con studi dedicati alle problematiche di genere e al danno prenatale e epigenetico

Risultati attesi nel triennio

Questo accordo di collaborazione scientifica costituisce un primo nucleo di struttura aggregativa e multidisciplinare sul fenomeno alcol. Da tale nucleo potrebbe svilupparsi un modello di approccio scientifico complesso. Risultati attesi

avviare un percorso scientifico che porti ad aggregare varie discipline al fine di migliorare le conoscenze in ambito alcolologico e di programmi di salute pubblica

facilitare lo scambio di conoscenze, di materiali, di metodologie e di personale specializzato in campo alcolologico e di tossici ambientali

promuovere la formazione di gruppi di lavoro con approccio innovativo e sinergico rispetto alle problematiche dell'esposizione ad elementi e sostanze tossiche o potenzialmente tali

promuovere l'offerta formativa con nuovi corsi di formazione multidisciplinari

valorizzare le reciproche risorse in termini di esperienze e di collaborazioni scientifiche nel rispetto delle competenze delle parti contraenti descritte negli atti istitutivi dell'Istituto Superiore di Sanità e del Centro di Riferimento Alcolologico Regione Lazio. Ciò renderà possibile effettuare anche studi ad elevata specializzazione su popolazioni selezionate di pazienti

Trasferibilità dei risultati

Da anni è stata avviata una proficua collaborazione scientifica tra L'Istituto Superiore di Sanità e il Centro di Riferimento Alcolologico Regione Lazio su temi di interesse alcolologico. Dalla positiva esperienza comune e dalla necessità sempre più urgente di affrontare una problematica tanto complessa quanto diffusa nella popolazione generale, è nata l'esigenza di strutturare questo accordo di collaborazione che coinvolge più competenze multidisciplinari. La trasferibilità dei risultati è uno degli obiettivi primari dell'accordo di collaborazione e è già una realtà che si realizza in vari ambiti: con l'applicazione nella clinica di nuovi bioindicatori alcolologici; con l'introduzione di procedure analitiche nuove e/o migliorate messe a punto nel corso di studi collaborativi; con lo scambio di interventi in *meeting* nazionali e internazionali sulla ricerca alcolologica, con l'organizzazione di incontri per operatori sanitari e sociali.

Aggiornamento dello studio di mortalità per causa specifica fra i lavoratori della Raffineria API di Falconara Marittima e caratterizzazione epidemiologica preliminare del sito di interesse nazionale di Basso Bacino Fiume Chienti

Il progetto si propone di costruire un percorso di studio epidemiologico di due aree a rischio ambientale della Regione Marche impiegando un approccio di analisi geografica della mortalità e delle fonti di pressione ambientale nel territorio della Val di Chienti, e un approccio di coorte finalizzato alla valutazione del rischio occupazionale nel sito di Falconara (b).

Risultati attesi nel triennio

Studio della distribuzione spaziale delle principali cause di morte nell'area in esame, con identificazione di eventuali *cluster*. Costruzione di una base di dati georeferenziati sulla distribuzione delle principali fonti di contaminazione ambientale nel territorio in esame.

Analisi della coorte della raffineria di Falconara con particolare attenzione al ruolo delle variabili temporali e interpretazione dei risultati alla luce dei dati ambientali disponibili

Trasferibilità dei risultati

Lo studio della Valle del Chienti rappresenterà un modello relativo allo studio integrato della distribuzione spaziale delle cause di morte e delle principali fonti di pressione ambientale in un sito inquinato. Il disegno dello studio e le procedure messe a punto potranno quindi essere utilizzate con riferimento ad altri siti di interesse nazionale per le bonifiche.

Lo studio di coorte di Falconara rappresenterà una procedura di lavoro replicabile in altre aree caratterizzate dalla presenza di raffinerie. Questo tema è di interesse generale non solo nei paesi industrializzati come l'Italia ma anche nei Paesi in via di sviluppo, in particolare in quelli produttivi di petrolio. Esperienze specifiche di cooperazione scientifica in questo settore sono in corso con l'Ecuador (R. Harari, P. Comba, D. Marsili, R. Pirastu. Rapporti ISTISAN 06/1).

Alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA nelle malattie infiammatorie croniche intestinali: possibili implicazioni cliniche

Le Malattie Infiammatorie Intestinali (MICI) sono caratterizzate da un processo infiammatorio cronico della mucosa dell'apparato gastro-enterico e da un andamento costituito da cicliche fasi di recrudescenza e remissione non tendenti alla guarigione. A tutt'oggi i meccanismi eziopatogenici delle MICI non sono completamente chiariti. Approssimativamente nel 50% dei casi studiati è presente Instabilità dei Microsatelliti (MSI), marcatore caratteristico di un difetto nel sistema di riparazione del danno al DNA noto come *Mismatch Repair* (MMR). Inoltre la natura infiammatoria di questa patologia e il ruolo centrale del *Base Excision Repair* (BER) nella riparazione del danno ossidativo suggeriscono il coinvolgimento di quest'altra via riparativa nella patogenesi delle MICI. L'efficienza dei meccanismi di riparazione assume un'importanza cruciale nella risposta ad alcune classi di farmaci. Allo scopo di chiarire il ruolo dei meccanismi di riparazione in queste patologie ci proponiamo di analizzare la frequenza e le possibili implicazioni di alterazioni del MMR e del BER in una casistica pediatrica di MICI. L'associazione dei dati molecolari ottenuti con le caratteristiche epidemiologiche, istologiche, cliniche e prognostiche della malattia ci fornirà informazioni utili nelle scelte di gestione e terapia di tali patologie. Tale ricerca sarà condotta in collaborazione con le U.O. di Gastroenterologia, U.O. e Anatomia Patologica dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma.

Risultati attesi nel triennio

Dai risultati ottenuti ci aspettiamo di caratterizzare ulteriormente le basi molecolari responsabili della MSI nelle MICI e in particolare ci attendiamo di verificare se alterazioni in entrambe le vie riparative concorrano o siano mutualmente esclusive nella determinazione del fenotipo instabile. Ci proponiamo inoltre di individuare sottogruppi con difetti nel MMR e/o nel BER. Considerata l'importanza dei sistemi di riparazione nella protezione del genoma dalle mutazioni spontanee e indotte, ci aspettiamo di individuare associazioni importanti con caratteristiche cliniche della malattia quali esposizione a fattori ambientali, familiarità, andamento clinico, estensione della malattia, risposta al trattamento e rischio di evoluzione neoplastica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti ci permetteranno di individuare sottogruppi di pazienti affetti da MICI con alterazioni della riparazione del DNA via MMR e/o BER. Dall'analisi statistica di associazione con caratteristiche cliniche e prognostiche della malattia potremo ricavare importanti criteri guida nella scelta delle opzioni terapeutiche. È noto in letteratura che un difetto nel MMR si associa a resistenza ad alcune classi di sostanze quali i metilanti e le tiopurine. A quest'ultima categoria di composti appartengono l'azatioprina e la 6-mercaptopurina comunemente usati nella terapia di mantenimento delle MICI. Pertanto la conoscenza dell'efficienza dei sistemi di riparazione del genoma in questi pazienti, riveste un ruolo di fondamentale importanza. Inoltre l'overespressione dei geni del BER può essere utilizzata come biomarcatore di esposizione a *stress* ossidativo e quindi come indicatore del grado di infiammazione tissutale.

Alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA nelle malattie infiammatorie croniche intestinali: possibili implicazioni cliniche

Le Malattie Infiammatorie Intestinali (MICI) sono caratterizzate da un processo infiammatorio cronico della mucosa dell'apparato gastro-enterico e da fasi cicliche di recrudescenza e remissione non tendenti alla guarigione. A tutt'oggi i meccanismi eziopatogenici delle MICI non sono completamente chiariti. Approssimativamente nel 50% dei

casi studiati è presente Instabilità dei Microsatelliti (MSI), marcatore caratteristico di un difetto nel sistema di riparazione del danno al DNA noto come *Mismatch Repair* (MMR).

La natura infiammatoria di questa patologia e il ruolo centrale del *Base Excision Repair* (BER) nella riparazione del danno ossidativo suggeriscono il coinvolgimento di quest'altra via riparativa nella patogenesi delle MICI. L'efficienza dei meccanismi di riparazione assume un'importanza cruciale nella risposta ad alcune classi di farmaci. Allo scopo di chiarire il ruolo dei meccanismi di riparazione in queste patologie ci proponiamo di analizzare la frequenza e le possibili implicazioni di alterazioni del MMR e del BER in una casistica pediatrica di MICI. L'associazione dei dati molecolari ottenuti con le caratteristiche epidemiologiche, istologiche, cliniche e prognostiche della malattia ci fornirà informazioni utili nelle scelte di gestione e terapia di tali patologie. Tale ricerca sarà condotta in collaborazione con l' U.O. di Gastroenterologia dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma.

Risultati attesi nel triennio

Dai risultati ottenuti ci aspettiamo di caratterizzare ulteriormente le basi molecolari responsabili della MSI nelle MICI e in particolare ci attendiamo di verificare se alterazioni in entrambe le vie riparative concorrano o siano mutualmente esclusive nella determinazione del fenotipo instabile. Ci proponiamo inoltre di individuare sottogruppi con difetti nel MMR e/o nel BER. Considerata l'importanza dei sistemi di riparazione nella protezione del genoma dalle mutazioni spontanee e indotte, ci aspettiamo di individuare associazioni importanti con caratteristiche cliniche della malattia quali esposizione a fattori ambientali, familiarità, andamento clinico, estensione della malattia, risposta al trattamento e rischio di evoluzione neoplastica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti ci permetteranno di individuare sottogruppi di pazienti affetti da MICI con alterazioni della riparazione del DNA via MMR e/o BER. Dall'analisi statistica di associazione con caratteristiche cliniche e prognostiche della malattia potremo ricavare importanti criteri guida nella scelta delle opzioni terapeutiche. È noto in letteratura che un difetto nel MMR si associa a resistenza ad alcune classi di sostanze quali i metilanti e le tiopurine. A quest'ultima categoria di composti appartengono l'azatioprina e la 6-mercaptopurina comunemente usati nella terapia di mantenimento delle MICI. Pertanto la conoscenza dell'efficienza dei sistemi di riparazione del genoma in questi pazienti, riveste un ruolo di fondamentale importanza. Inoltre l'overespressione dei geni del BER può essere utilizzata come biomarcatore di esposizione a *stress* ossidativo e quindi come indicatore del grado di infiammazione tissutale.

Analisi funzionale di geni patologici implicati nel mantenimento dell'integrità del genoma

Comprensione del significato biologico delle interazioni tra diverse vie di riparazione del danno al DNA nel controllo del danno ossidativo utilizzando sia modelli *in vitro* che *in vivo*. Messa a punto di nuovi saggi funzionali per *high-throughput screening* della capacità di riparazione di cellule umane in studi di popolazione.

Messa a punto di protocolli ad elevata sensibilità per l'identificazione di proteine mediante spettrometria di massa.

AQUAME Definizione dei corpi idrici di riferimento nell'area mediterranea per l'implementazione della Direttiva quadro 2000/60

La Direttiva Comunitaria, partendo dall'assunto che "l'acqua non è un prodotto commerciale al pari degli altri" bensì un patrimonio che va protetto e trattato come tale, introduce programmi e misure, modalità e scadenze vincolanti per ogni stato membro finalizzati a:

Preservare il capitale naturale delle risorse idriche per le generazioni future riducendo il deterioramento degli ecosistemi acquatici (Sostenibilità ecologica);

Allocare in termini efficienti una risorsa scarsa come l'acqua (Sostenibilità economica);

Garantire l'equa condivisione e accessibilità per tutti ad una risorsa fondamentale per la vita e la qualità dello sviluppo economico (Sostenibilità etico – sociale).

La stessa Direttiva pone al centro dell'attenzione il tema della qualità dei corpi idrici per i quali viene prospettato il raggiungimento di "buon stato ecologico" entro il 2015.

Il raggiungimento del "buono stato" della qualità delle acque superficiali e sotterranee si dovrà ottenere attraverso:

l'attuazione dei principi di precauzione e di azione preventiva;

la riduzione, soprattutto alla fonte, dei danni causati all'ambiente e alle persone;

il criterio ordinatore di "chi inquina paga".

La realizzazione di questo processo è sostenuta dalla Strategia Comune per l'implementazione della Direttiva Quadro decisa dai Direttori delle Acque degli Stati membri nel Maggio 2001 in Svezia attraverso l'istituzione di 10 gruppi di lavoro che si sono occupati di tutte le tematiche attinenti i corpi idrici: dall'analisi delle pressioni e degli impatti all'individuazione di corpi idrici altamente modificati, alla guida per la realizzazione di un protocollo di intercalibrazione, ai sistemi di georeferenziazione.

La cooperazione interregionale consentirà una fattiva collaborazione finalizzata al reciproco scambio di informazioni e di esperienze maturate sul campo e costituisce un elemento chiave di successo delle politiche di sviluppo e di coesione regionale. Il progetto INTERREG III B-MEOCC-AQUAME intende applicare in diversi paesi e regioni del bacino del Mediterraneo tre delle linee guida elaborate dai gruppi di lavoro di cui sopra. In particolare è stato previsto che la sua realizzazione sia suddivisa in tre fasi:

La redazione di uno studio per ciascuna regione interessata, in cui sono definiti il quadro legislativo vigente sia a livello nazionale che a livello locale, un'analisi dettagliata degli studi pregressi riguardanti il territorio oggetto del progetto, l'analisi economica della gestione della risorsa in tutti i suoi aspetti.

Lavoro separato dei *partner* con l'obiettivo di applicare ad un bacino ricadente nel proprio territorio tre delle linee guida sviluppate dai gruppi di lavoro europei sull'applicazione della FWD riguardanti:

Classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali e identificazione delle condizioni di riferimento

Analisi economica

Monitoraggio

Creazione di tre gruppi di lavoro transnazionali che redigano tre documenti sintetici con le esperienze delle fasi precedenti e le osservazioni sull'applicabilità delle linee guida europee con una loro analisi critica e eventuali proposte di modifica:

GRUPPO 1 "Classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali e identificazione delle condizioni di riferimento" coordinato dall'Italia cui faranno parte l'Italia con l'ARPAT, Regione Lombardia, APAT, ISS e la Francia con il *Département Hérault (Agence de l'eau)*

GRUPPO 2 "Analisi economica della gestione di un bacino idrografico", coordinato dalla Spagna (*Conseil Insulaire de Minorque*) cui parteciperanno l'Italia con la Regione Toscana e la Spagna con il *Conseil Insulaire de Minorque*

GRUPPO 3 “La definizione di una rete di monitoraggio”, in accordo con i contenuti della direttiva quadro 2000/60/CE, coordinato dalla Francia (*Département HERAULT*) cui faranno parte l’Italia con ARPA Sicilia, Regione Liguria; la Francia con il *Département de l’Herault* e la Spagna con IGME, *Députation de Barcelone*.

Infine sarà realizzata la valutazione dell’applicabilità dei risultati su tre bacini scelti in base a dimensioni e caratteristiche diverse. I tre gruppi saranno coordinati da Italia, Spagna e Francia.

Risultati attesi nel triennio

L’intero progetto permetterà di:

realizzare *test* sui bacini pilota, seguendo le indicazioni e i contenuti delle linee guida previste dallo stesso progetto e la loro ottimizzazione attraverso i gruppi di lavoro transnazionali al fine di ottemperare alle prescrizioni previste dalla direttiva quadro,

sostenere la realizzazione degli obiettivi previsti dalle politiche comunitarie per la gestione sostenibile della risorsa idrica,

mettere in evidenza gli specifici rapporti esistenti tra utilizzo del territorio e stato ecologico dei corpi idrici superficiali e sotterranei,

realizzare una serie di interventi che possono rappresentare una base efficace per lo sviluppo di sistemi a supporto alle azioni politiche.

Trasferibilità dei risultati

Metodologie, linee guida, rapporti, pubblicazioni.

Aspetti igienico-sanitari di particolari insediamenti di tipo urbano

Il settore della Polizia Mortuaria per molti aspetti ricade sotto la legislazione ambientale, tuttavia, per motivi etici, religiosi, psicologici nonché per motivi di carenza di definizione del settore per quanto riguarda la sua appartenenza al settore produttivo o civile, necessita di una propria normativa. A tale scopo è necessario uno studio dei sistemi in uso e utilizzabili al fine di inquadrare gli ambienti sia interni (ambienti di lavoro: carro funebre, obitori, cimiteri, crematori) entro cui avvengono determinate operazioni che esterni per quanto riguarda le emissioni liquide, gassose, solide ecc. (emissioni crematori, diffusione inquinanti nel terreno, rifiuti generati durante le varie fasi ecc.).

Di fatto in questi ultimi anni si osserva in Italia un incremento delle richieste di ricorso alla pratica della cremazione dovuto anche alla Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 31 luglio 1998, a fronte di una generalizzata carenza riguardo alla potenzialità degli impianti esistenti. Pertanto, la presenza di forni crematori le cui emissioni destano una maggiore attenzione, sia per le loro proprietà intrinseche che per la loro concentrazione: il mercurio e i composti organici (PCDD, PCDF, COV, IPA) può conferire ai cimiteri connotati di tipo “industriale”.

Risultati attesi nel triennio

Definizione dei requisiti che i materiali, dispositivi, manufatti e impianti devono avere dal punto di vista meccanico, igienico-sanitario e ambientale.

Valutazione impianti di cremazione e relative emissioni.

Valutazione quantità di mercurio e di composti organici emesse per cremazione nel processo di cremazione.

Trasferibilità dei risultati

Procedure di sicurezza per i lavoratori all’interno degli ambienti e della popolazione che vive nelle vicinanze di particolari insediamenti.

Base excision repair: mechanisms and relevance to cancer susceptibility (2005-2006)

L'obiettivo principale di questo progetto è lo studio del coinvolgimento della DNA polimerasi beta, la principale polimerasi nella riparazione per escissione di basi (*Base Excision Repair*, BER) nella stabilità del genoma e in particolare nella risposta allo *stress* ossidativo. A questo scopo verranno seguiti due approcci: i) uso di sistemi cellulari murini che esprimono diversi livelli della DNA polimerasi beta, o difettivi in altri geni del BER quali le DNA glicosilasi specifiche per il danno ossidativo, e ii) identificazione e caratterizzazione di varianti della DNA polimerasi beta in tumori umani.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono i seguenti: 1) valutazione degli effetti sulla mutagenesi spontanea e indotta di alterazioni nell'espressione di geni del BER in cellule di mammifero; 2) comprensione dell'instabilità genetica associata allo stress ossidativo; 3) valutazione della rilevanza di specifiche combinazioni di difetti genetici nella riparazione del DNA in presenza di induzione di danno del DNA: un modello di "interazione gene-ambiente"; 4) identificazione e rilevanza di varianti della DNA polimerasi beta nel cancro gastrico; 5) comprensione delle basi molecolari dello *splicing* alternativo della DNA polimerasi beta; 6) valutazione del contributo di difetti nel BER nell'insorgenza del cancro gastrico.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni derivate da questo studio forniranno una migliore comprensione del ruolo svolto da difetti nel meccanismo di riparazione BER nell'insorgenza di tumori, in particolare del cancro gastrico. Nel lungo termine, queste informazioni potrebbero tradursi in nuovi bersagli e metodologie terapeutiche.

Caratterizzazione degli ambienti e delle tecnologie di allevamento per la certificazione ambientale e di qualità delle produzioni pugliesi di maricoltura in gabbia

Il progetto comprende la caratterizzazione del contributo dell'ambiente nel determinare l'esposizione e il bioaccumulo di contaminanti tossici persistenti, metalli pesanti, radionuclidi, polibromodifenil eteri (PBDFE), composti organostannici, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), pesticidi organoclorurati, policlorobifenili (PCB) e "diossine" in pesci provenienti da due allevamenti *offshore*. In particolare, tale caratterizzazione avverrà attraverso l'identificazione delle fonti di emissione derivate da attività antropiche situate sulla costa, il regime idrodinamico degli insediamenti produttivi, l'analisi di acqua e sedimenti. Ai fini di una adeguata caratterizzazione, verrà identificato il contributo proveniente dalle pratiche di allevamento e dai materiali utilizzati nel bioaccumulo di contaminanti. Tale approccio risulterà idoneo allo sviluppo di metodi d'indagine valutabili ai fini della caratterizzazione geografica della filiera e della sua certificazione sanitaria. Inoltre, sui pesci verranno considerati parametri anatomici, fisiologici e biochimici di benessere animale come possibili indicatori di esposizione e di bioaccumulo di tali contaminanti.

Risultati attesi nel triennio

Scelta dei criteri per la georeferenziazione degli insediamenti di acquacoltura rispetto alle attività antropiche che insistono sulla costa e, eventualmente, all'apporto di contaminanti dovuto alla presunta esposizione di fondo ambientale. In particolare, verrà valutata: i) la componente ambientale nel determinare la bioconcentrazione nei pesci dei contaminanti selezionati rispetto al bioaccumulo totale; ii) la componente zootecnica (mangimi, pratiche di allevamento, mezzi di produzione impiegati) nel determinare la biomagnificazione nei pesci dei contaminanti selezionati rispetto al bioaccumulo totale. Tali valutazioni analitiche saranno correlate con i

parametri di benessere animale presi in considerazione. Altrettanto importante a fini manageriali è la georeferenziazione delle determinazioni analitiche delle attività di acquacoltura al fine della loro qualificazione ambientale e sanitaria per lo sviluppo (attraverso l'identificazione degli apporti ambientali-zootecnici) di opportune pratiche d'allevamento atte a limitare il bioaccumulo dei contaminanti precedentemente indicati.

Trasferibilità dei risultati

Stesura dei protocolli operativi *standard* secondo le norme ISO, in modo da garantire la trasferibilità e la confrontabilità dei risultati ottenuti sia in sede nazionale che internazionale. Il risultato finale atteso comprende una valutazione della ricaduta sul territorio per quanto concerne la conoscenza dei fattori di rischio ambientali-alimentari nell'acquacoltura. Dopo aver effettuato uno *screening* completo in due tipologie di allevamenti paradigmatiche delle condizioni nella Regione Puglia, sarà possibile stabilire dei parametri di riferimento specifici per certificare la filiera produttiva pugliese del pesce di gabbia, già oggi una delle maggiori realtà riproduttive dell'acquacoltura regionale e che avrà un grande sviluppo negli anni futuri.

Collection and Evaluation of (Q)SAR models for mutagenicity and carcinogenicity

Nella legislazione corrente per le Sostanze Chimiche Nuove e Esistenti dell'Unione Europea (EU), l'uso a livello regolativo dei concetti e metodi basati sullo studio delle relazioni Struttura-Attività è ancora molto limitato. Il 29 Ottobre 2003 l'EU ha adottato una nuova legislazione (REACH) che prevede pari richieste di informazione sul rischio chimico sia per le sostanze Nuove che per quelle Esistenti. Dato che per le sostanze Esistenti i dati tossicologici e chimico fisici che saranno richiesti sono in larga parte inesistenti, sarà necessario nei prossimi 10 anni uno sforzo enorme da parte dell'industria per corredare di tali informazioni circa 30.000 sostanze. Per ragioni pratiche, di costo-beneficio e di benessere animale, si è pure deciso di far giocare un ruolo importante ai cosiddetti test alternativi, e tra questi ai metodi teorici come quelli basati sulle Relazioni Struttura-Attività. Tali sistemi teorici hanno come fine quello di stimare il rischio posto dalle sostanze chimiche, usando come informazione di partenza solo la struttura chimica. In questo ambito, l'EU ha iniziato una attività scientifica di larga portata tesa a supportare la nuova legislazione. Uno degli obiettivi è quello di identificare e valutare i modelli Struttura-Attività esistenti.

Lo scopo di questa ricerca è di valutare criticamente i modelli Quantitativi Struttura-Attività (QSAR), non commerciali, esistenti per la cancerogenesi e mutagenesi, alla luce di principi scientifici generali e delle specifiche esigenze della nuova legislazione.

Risultati attesi nel triennio

La prima fase della ricerca riguarda l'individuazione dei modelli QSAR esistenti nella letteratura. Una volta individuati, si verificherà la validità dei modelli stessi, in termini di correttezza statistica, di significato meccanicistico e di valore scientifico. Una volta identificati i modelli più validi e promettenti, su questi si eseguiranno ulteriori analisi, se necessario, al fine di dotarli delle informazioni richieste dalla nuova legislatura europea.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno usati dall'*European Chemical Bureau* per contribuire: i) allo sviluppo di strategie integrate di saggio; ii) all'attività del Gruppo europeo sullo QSAR, che partecipa allo sviluppo di linee guida sull'uso dello QSAR e sulle categorie chimiche e alla creazione di un compendio europeo di modelli QSAR accettati; iii) all'EU QSAR *Experience Project*, volto a promuovere la conoscenza QSAR tra le autorità regolative europee; iv) alla stesura di linee guida OECD; v) allo sviluppo di un sistema esperto europeo computerizzato (QSAR *Application Toolbox*), con la collaborazione dell' OECD.

Contaminanti negli ambienti di vita: esposizione a composti emessi dalle attività lavorative domestiche, dai materiali di costruzione, dall'arredo e da altre fonti emissive

È ormai accertato che anche i materiali edilizi, gli arredi e i rivestimenti e le attività lavorative e domestiche rappresentano una fonte d'inquinamento. Diversi studi, hanno dimostrato che i livelli *indoor* sono maggiori rispetto a quelli *outdoor* per alcune classi di inquinanti, in particolar modo per alcune classi di composti: VOC (incluse le aldeidi), IPA e composti organoalogenati. I materiali da costruzione e da arredo, i mobili, le tappezzerie, i collanti usati per la loro installazione, nonché le attività lavorative e domestiche liberano composti organici nell'aria interna.

In Italia, inoltre, si sono imposti nuovi criteri tecnico-progettuali per gli edifici ad uso civile. La necessità di contenere i consumi per il riscaldamento e per la ventilazione ha imposto un migliore isolamento degli edifici, con conseguente spinta a sigillare gli ambienti interni e a minor ricambio di aria. Alle modifiche strutturali degli edifici si sono accompagnate modifiche rilevanti degli arredi (nuovi materiali per mobili, rivestimenti, ecc.) e degli strumenti di lavoro nonché il crescente impiego di apparecchiature, impianti tecnologici nel caso di ospedali.

Tutto questo rischia di incrementare l'esposizione umana ai contaminanti negli ambienti di vita. È quindi necessario a questo fine monitorare la situazione e prevedere provvedimenti a tutela dell'igiene edilizia e ospedaliera in particolare.

Il progetto si propone di acquisire informazioni, attualmente mancanti per le sostanze emesse dalle nuove apparecchiature e estremamente carenti per gli altri contaminanti, sui livelli che si trovano all'interno degli ambienti di vita con connesse attività lavorative e domestiche.

Risultati attesi nel triennio

Livelli *indoor* di microinquinanti organici: COV (incluse aldeidi) IPA, PBDE, PCB e altri inquinanti; possibilità di stimare il peso relativo dell'esposizione *indoor* rispetto all'*outdoor*.

Identificazione delle potenziali fonti di rischio associate alle attività lavorative, domestiche nonché ai processi utilizzati nella produzione di prodotti edilizi, di arredo, posa in opera e rifinitura dell'edilizia.

Contenitori per alimenti in materiali a base cellulosa: interazioni con alimenti, uso di fibre di riciclo, meccanismi di trasferimento, simulazione e modellizzazione

Il piano prevede lo studio delle interazioni materiali/alimento nel settore degli imballaggi in carte e cartoni. I meccanismi di trasferimento dei migranti sono infatti diversi dai meccanismi alla base dei fenomeni di migrazione da materie plastiche.

Risultati attesi nel triennio

Saranno sviluppati studi di cinetiche in diverse condizioni e per diverse categorie di migranti e alimenti.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche.

Accordo di collaborazione scientifica sulle prove interlaboratorio riguardanti analisi di carattere microbiologico su matrici acquose

L'accordo, che è in corso dal 2000 e è stato rinnovato nel 2003, è portato avanti con prove interlaboratorio riguardanti analisi microbiologiche su matrici acquose con obiettivi diversificati (ad esempio, valutazione di parametri di precisione, convalida di metodi) e concordati di volta in volta. Le prove interlaboratorio sono condotte almeno 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 microbiologiche e l'assicurazione della qualità dei risultati analitici nonché validazione, ecc.

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.

Destino ambientale delle tossine da fioriture algali in ambienti acquatici di diversi tipi e origini, 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 2006-2008 l'indagine sulla diffusione e tipologia delle fioriture tossiche nelle acque italiane e sull'incidenza sanitaria della loro presenza verrà estesa alle possibilità del bioaccumulo lungo la piramide alimentare, mediante lo studio di comunità ittiche in ambienti acquatici esemplificativi.

Verrà studiato l'effetto delle preparazioni culinarie sulla persistenza delle tossine algali accumulate in fauna ittica soggetta a consumo alimentare.

Verranno inoltre studiate strategie di recupero innovative dei corpi d'acqua che prevedano usi umani alimentari, con la ideazione di piani di recupero dall'eutrofizzazione di corpi idrici gravemente compromessi, per la gestione e eliminazione del rischio sanitario originato.

La raccolta in banca dati delle fioriture algali tossiche nel territorio nazionale organizzata nel Progetto ISS 2003-2004 C3F7 verrà revertita in una forma versatile, che permetta un futuro utilizzo pubblico semplice e diretto nell'ambito delle indicazioni organizzative stabilite dalle recenti 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 e analisi in spettrometria di massa da tessuti di vertebrati e invertebrati appartenenti alla fauna ittica.

Verranno indagate nuove tecnologie per la modifica delle condizioni ambientali predisponenti fioriture tossiche con rischio di contaminazione per la fauna ittica. Verranno individuate tecnologie informatiche per semplificare con efficienza l'accesso *on-line* alla banca dati delle fioriture algali italiane.

Trasferibilità dei risultati

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

Determinazione dello stato di benessere in suini allevati per la produzione di bioprotesi mediante analisi di indicatori comportamentali e morfo-fisiologici

Valutazione dei parametri biochimico-clinici, con particolare riferimento alla valutazione dello *stress* ossidativo, mediante dosaggio dei metaboliti reattivi dell'ossigeno e del potere

antiossidante totale, in sieri di suini appartenenti a linee genetiche a differente accrescimento ponderale.

Risultati attesi nel triennio

Correlazione dei profili biochimico-clinici con la genetica delle linee ad alta e bassa produttività

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità dei risultati ai laboratori veterinari impegnati nella valutazione biochimica-clinica del benessere animale

Determinazione di protozoi in acque da destinare e destinate al consumo umano con particolare riguardo alla valutazione dei rischi igienico-sanitari legati al loro utilizzo

Nell'ambito della Direttiva Europea 83/98/CE sulle acque destinate al consumo umano, recepita in Italia con il DL.vo n. 31 del 2001 e s.m. viene richiesta la ricerca di protozoi patogeni nelle acque ad uso umano. È in questo ambito che si inserisce la ricerca che si propone di determinare la presenza e il livello di diffusione dei protozoi patogeni *Giardia* e *Cryptosporidium* in acque da destinare e destinate al consumo umano, nella Regione Lazio, per l'accertamento del rischio legato alla loro presenza nelle popolazioni esposte, e in particolare nella popolazione infantile. Inoltre, verrà verificata l'efficienza dei trattamenti di depurazione delle acque per l'abbattimento della concentrazione di questi organismi caratterizzati per una elevata resistenza alle più comuni pratiche di trattamento delle acque anche in funzione della frequenza della loro distribuzione nell'ambiente.

Risultati attesi nel triennio

stima della frequenza e diffusione di *Giardia* e *Cryptosporidium* in acque destinate al consumo umano e in acque da destinare all'uso potabile della Regione Lazio;

predisposizione di specifici protocolli per la proposizione di modifiche e integrazioni alle norme legislative vigenti, anche relativi alle modalità di campionamento, trasporto e metodologie analitiche;

stesura di rapporti tecnici per la formazione e l'aggiornamento degli operatori addetti al controllo della qualità delle acque nella Regione Lazio

Trasferibilità dei risultati

Lo studio prevede la stesura di rapporti tecnici per l'adeguamento alla nuova normativa italiana sulle acque destinate al consumo umano e per la formazione e l'aggiornamento degli operatori addetti al controllo della qualità delle acque nella Regione Lazio.

DNA repair and genome instability in hematopoietic stem cells and acute myeloid leukaemia

Studio delle vie di riparazione del danno al DNA in cellule staminali emopoietiche. Ruolo di difetti nella riparazione del DNA nelle leucemie mieloidi acute.

Esame di alcune tipologie di rifiuti e materiali ottenuti dal loro recupero/riciclo. Aspetti igienico-sanitari e ambientali legati all'uso come fonti energetiche dei rifiuti e delle diverse tipologie di CDR

Raccolta e elaborazione di dati sperimentali con particolare attenzione ad impianti italiani funzionanti a CDR. Rilevamenti su un impianto funzionante a CDR e valutazione della diffusione e ripartizione degli inquinanti con particolare riferimento ad alcuni microinquinanti

persistenti, sia organici sia inorganici. Valutazione dei dati raccolti e dei dati sperimentali, elaborazione degli stessi mediante modelli di diffusione e di ripartizione per una stima dei possibili livelli ambientali relativamente al caso in studio

Risultati attesi nel triennio

Approfondimento delle tematiche già trattate, in particolare sugli aspetti di impatto sulla salute umana e sul destino ambientale degli inquinanti emessi sia nel comparto aria sia come reflui liquidi, scorie e ceneri. Applicazione di appositi modelli, su casi reali presi come studio, al fine di effettuare una stima dei rischi ambientali, valutare le vie di esposizione della popolazione e individuare le possibili mitigazioni.

Trasferibilità dei risultati

La stima dei rischi ambientali e la valutazione delle vie di esposizione della popolazione consente di individuare le possibili mitigazioni. Riguardo agli aspetti legati all'accettazione sociale, l'individuazione dei determinanti che concorrono alla percezione del rischio e l'individuazione dei bisogni informativi contribuisce alla formulazione delle procedure di consenso informato.

Esame e valutazione delle emissioni di impianti italiani di combustione di CDR: carico inquinante, recupero energetico, fattori di emissione

Lo studio esamina un certo numero di impianti, scegliendo quelli più significativi, considerando essenzialmente la potenzialità e la alla adeguatezza impiantistica alla luce delle BAT di riferimento (vedi *Bref* su incenerimento rifiuti e *Bref* su grandi impianti di combustione, maggio 2005). Le valutazioni che verranno effettuate saranno relative ai dati di emissione, alle condizioni di funzionamento correlate e alla tecnologia, potenzialità e recupero energetico.

Risultati attesi nel triennio

Questo consentirà di tracciare un quadro di massima della situazione nazionale e calcolare (su dati reali) i fattori di emissione per i diversi inquinanti, sia in relazione alle caratteristiche del combustibile sia in relazione alla energia prodotta. Inoltre sarà possibile, considerando condizioni climatiche tipiche di aree italiane diverse (nord, sud, pianura, ecc.) definire le possibili concentrazioni al suolo utilizzando modelli di ricaduta di validità riconosciuta.

Trasferibilità dei risultati

Le risultanze di tali valutazioni consentiranno confronti omogenei con altre tecnologie di smaltimento e di produzione di energia e potranno costituire una base di dati solida per valutazioni ambientali e per consentire scelte decisionali e/o operazioni di corretta comunicazione alle popolazioni interessate (per questo ultimo aspetto si prevede la produzione di specifiche pubblicazioni adatte ad una divulgazione generale).

Esposizione a sostanze chimiche da giocattoli. Applicazione di tecniche predittive per la prevenzione del rischio

Lo studio prevede l'effettuazione di test di rilascio di sostanze chimiche da materiali costituenti giocattoli, in condizioni di simulazione dell'uso reale da parte dei bambini. Particolare attenzione sarà posta sui giocattoli destinati ai primi tre anni di vita.

Risultati attesi nel triennio

Le cinetiche di rilascio verranno utilizzate per verificare la possibilità di applicazione di modelli predittivi anche nel settore dei giocattoli, ai fini della identificazione dei pericoli e prevenzione dei rischi.

Trasferibilità dei risultati

Linee Guida, Laboratori SSN, Pubblicazioni Scientifiche

Esposizione dell'uomo a materiali naturali e di sintesi. Rischi connessi con la cessione di contaminanti. Nuovi materiali e nuovi approcci

1. materie plastiche di riciclo: produzione di dati sperimentali utili per la individuazione di corrette condizioni di produzione e uso di oggetti in materia plastica riciclata. L'obiettivo è di notevole ricaduta sul piano igienico-sanitario, tecnologico e industriale, poiché l'uso di materie plastiche di riciclo a diretto contatto con alimenti non è attualmente ammesso a causa della non disponibilità di conoscenze sufficienti sul comportamento migrazionale di manufatti riciclati in un secondo impiego. Anche la recente proposta di materiali multistrato con funzioni di barriera nei confronti della migrazione richiede studi sperimentali di approfondimento.

2. materiali non tradizionali (biodegradabili, naturali, ecc.): effettuare studi sperimentali di correlazione fra struttura chimica, prestazioni tecnologiche e migrazione su materiali biodegradabili (es. acido polilattico) di recente sviluppo per il contatto con alimenti.

3. materiali tradizionali e nuove problematiche: verifica sperimentale di alcuni materiali tradizionali nei confronti di nuove problematiche emerse. In particolare, verrà effettuato uno studio sulla migrazione reale da materiali ad alimenti solidi secchi attualmente esonerati dalle prove di cessione. I risultati saranno finalizzati alla revisione della classificazione convenzionale degli alimenti.

Risultati attesi nel triennio

1. svolgimento di prove su contenitori provenienti da operazioni industriali di recupero *post-consumo*, bonifica e riciclo. Ciò costituirebbe un utile contributo alla elaborazione di linee-guida e norme tecniche di gestione dei processi connessi con il riciclo di materie plastiche, anche ai fini di una possibile certificazione dell'intero processo produttivo.

2. caratterizzazione approfondita e verifica dell'idoneità tecnologica nonché del comportamento migrazionale dei materiali biodegradabili, effettuando studi sperimentali e di correlazione fra struttura chimica, prestazioni tecnologiche e di migrazione su materiali biodegradabili.

3. effettuazione prove di contatto fra materiali diversi (plastiche, carta, cartoni e metalli) e alimenti solido-secchi, con ricerca di sostanze migrate, per fornire un contributo per la revisione della classificazione convenzionale degli alimenti.

Tutti i metodi analitici saranno sottoposti a validazione. I risultati sperimentali saranno oggetto di pubblicazione su riviste scientifiche specializzate.

EU Integrate Project "Predicting chronic toxic effects in humans: a non animal-base structure approach integrating toxicodynamics and biokinetics" (Proposal acronym: CHRONstrucTIV)

L'obiettivo principale del progetto è quello di sviluppare una strategia che permetta la riduzione del numero di animali nella sperimentazione tossicologica, in risposta alla crescente richiesta di disporre di metodologie *in vitro* che possano essere predittive di effetti tossicologici anche a lungo termine. L'obiettivo sarà raggiunto attraverso la caratterizzazione degli aspetti tossicocinetici e tossicodinamici nella risposta cellulare ad effetti tossici *in vitro* di sostanze chimiche opportunamente selezionate. Il progetto tenterà anche di soddisfare uno dei principali problemi legati alla sperimentazione *in vitro*, vale a dire l'assenza di informazioni sulle dosi che debbano essere utilizzate per derivare i *non-observed-adverse-effect-levels* (NOAELs) come base per la valutazione del rischio. Infatti le dosi sistemiche eventualmente responsabili di un effetto non possono essere direttamente calcolati dalla concentrazione di una sostanza *in vitro*.

Per *end-points* considerati rilevanti e predittivi verranno determinate le *non-observed-effect-concentrations* (NOEC) per i composti parentali e i loro metaboliti e poi trasformate in equivalenti di dose nella specie umana utilizzando modelli matematici tra cui i modelli farmacocinetici a base fisiologica (*physiologically base 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 sperimentali non animali e che possa essere utilizzata a scopi regolatori per la identificazione di effetti tossici indotti da sostanze chimiche e/o dai loro metaboliti a medio e lungo termine.

La UO dell'ISS contribuirà essenzialmente agli obiettivi del *Workpackage 3 (Non animal-base models for in vitro kinetics and human kinetic prediction)* di cui avrà anche il Coordinamento, i cui risultati principali saranno 1) la identificazione dei parametri biocinetici rilevanti 2) la caratterizzazione biocinetica dei modelli sperimentali attraverso la misura e/o la predizione dei suddetti parametri 3) la identificazione di fattori di suscettibilità metabolica. I parametri identificati verranno forniti e discussi con le altre UUOO impegnate nell'uso dei modelli predittivi PBPK per la derivazione dei NOEAL.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto prevede di trasferire i propri risultati che potrebbero avere un notevole impatto su tutto il settore della tossicologia regolatoria, alla UE e in particolare a tutte le Autorità competenti in materia di sicurezza delle sostanze chimiche e dei farmaci. 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.

Fattori di suscettibilità agli effetti genotossici: basi genetiche e implicazioni nella cancerogenesi

Alla base della risposta individuale agli effetti dell'esposizione ad agenti genotossici e il conseguente rischio cancerogeno legato a tale esposizione, ci sono fattori di suscettibilità solo in parte identificati. Oltre a fattori legati allo stile di vita individuale, un ruolo fondamentale è svolto da fattori genetici responsabili della sintesi di proteine coinvolte nel metabolismo degli agenti chimici o nella riparazione dei danni a livello cellulare. Diverse evidenze indicano che la presenza di rare forme alleliche di geni coinvolti nella riparazione del DNA aumenta il rischio cancerogeno individuale di oltre 10 volte, ma il loro impatto sulla popolazione generale può essere considerato trascurabile. Diversamente varianti alleliche comuni (presenti in oltre l'1% della popolazione) a bassa penetranza fenotipica e rischio individuale relativamente basso, hanno un impatto non trascurabile sulla popolazione generale proprio per la loro larga diffusione. La caratterizzazione del fenotipo suscettibile può essere effettuata mediante tecniche che prevedono l'utilizzo di marcatori d'effetto biologico precoce come le aberrazioni cromosomiche e i micronuclei dopo trattamento in vitro dei linfociti di sangue periferico con specifici agenti genotossici.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi del piano triennale si possono riassumere in tre punti fondamentali:

Identificazione delle varianti alleliche, genotipiche e aploipiche, per geni coinvolti nella riparazione del DNA in grado di modulare significativamente la risposta individuale a specifici agenti genotossici capaci di indurre danno cromosomico. Considerato il ruolo predittivo di questi marcatori per il rischio di cancro, i risultati ottenuti, con tutte le incertezze sperimentale

associate, possono permettere, inoltre, di ottenere stime di rischio associate alle diverse varianti alleliche.

Validazione del CBMN *assay* (analisi dei micronuclei e ponti nucleocitoplasmatici in cellule binucleate) nei linfociti come biomarcatore di danno cromosomico indotto da agenti genotossici. La metodologia può essere una valida alternativa ad altre metodiche già standardizzate nella misura del danno cromosomico nella dosimetria da radiazioni

Validazione dell'utilizzo di linee cellulari linfoblastoidi per l'analisi fenotipica. L'utilizzo delle linee stabilizzate rappresenta un'utile alternativa ai linfociti primari per la facilità d'utilizzo e l'illimitata disponibilità di cellule che permetta una più completa caratterizzazione genotipica e fenotipica.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione e l'identificazione delle basi genetiche della suscettibilità individuale agli effetti genotossici e cancerogeni delle sostanze ambientali hanno una diretta rilevanza nel processo di valutazione del rischio, fornendo gli elementi conoscitivi necessari per la tutela delle fasce di popolazione più sensibili. Non è trascurabile, inoltre, che l'identificazione delle varianti genotipiche e aploipiche possa avere rilevanza anche per la risposta individuale a trattamenti chemio e radioterapici.

Horizontal Standards on Hygienic Microbiological parameters for Implementation of EU Directives on Sludges, Soils, Soil Improvers, growing Media and Biowastes

La ricerca si inserisce nella Task 1 "Development of sampling and analytical standards for hygienic parameters relevant for soil, biowaste and sludge" all'interno del Topic 1.5 Environmental assessment. Per quanto riguarda l'attività di ricerca svolta presso l'ISS, gli obiettivi strategici sono focalizzati allo sviluppo di metodi europei standardizzati di campionamento e analisi, validi e efficienti per parametri microbiologici da determinare in fanghi di depurazione da riutilizzare a scopo agricolo. I metodi valutati nell'ambito della ricerca potranno favorire lo sviluppo e l'adeguamento delle Direttive europee stabilite per la valutazione della qualità di matrici ambientali solide in funzione del riuso e del loro smaltimento. Lo studio prenderà in considerazione standard esistenti e svilupperà nuovi metodi analitici e di prelievo per parametri microbiologici, quali indicatori di contaminazione fecale e patogeni enterici.

Risultati attesi nel triennio

È prevista la produzione di metodi standardizzati per il campionamento e l'analisi di parametri microbiologici quali *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, uova di *Ascaris* in fanghi di depurazione, da presentare in formato CEN. Dove possibile (senza compromettere la precisione dei metodi per le diverse matrici) si uniformeranno i metodi valutati per matrici con le stesse caratteristiche. I nuovi metodi saranno sottoposti a validazione come parte essenziale dello sviluppo del progetto, in funzione delle caratteristiche di prestazione in termini di ripetibilità e riproducibilità.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio svolto verrà utilizzato per l'aggiornamento e la standardizzazione dei metodi per l'analisi microbiologica e il campionamento di matrici solide, quali i fanghi di depurazione. I metodi validati verranno inseriti all'interno delle Direttive Europee che prevedono anche lo svolgimento dei controlli di qualità di fanghi di depurazione da riutilizzare in agricoltura.

Identificazione di fattori di suscettibilità agli effetti di pesticidi, con particolare attenzione a polimorfismi metabolici, vulnerabilità legata alle diverse fasce di età e fenomeni di interazione dovuti ad esposizioni combinate

Il progetto si propone di contribuire alla conoscenza dei meccanismi alla base della diversa suscettibilità agli effetti di alcune classi di pesticidi (es. organofosforotionati e carbammati) largamente utilizzati sia in campo agricolo che in ambito domestico e maggiori responsabili dei casi di intossicazione registrati negli ultimi anni. La diversa suscettibilità può essere dovuta a 1) caratteristiche genetiche. È noto che polimorfismi genetici negli enzimi del metabolismo dei pesticidi alterano l'equilibrio tra bioattivazione e detossificazione, che spesso ne determina la tossicità. 2) a caratteristiche legate alle diverse fasce di età. Neonati e bambini possono essere infatti particolarmente vulnerabili nei confronti dei rischi derivanti dall'esposizione a pesticidi, per diverse ragioni, tra cui il grado di maturazione non ancora completo dei loro organi interni, la funzionalità ancora incompleta dei sistemi metabolici nei confronti degli xenobiotici e il fatto che, in relazione al loro peso, i bambini mangiano più degli adulti.

Un ulteriore problema nella valutazione del rischio, che procede considerando ogni pesticida singolarmente, deriva dalla discrepanza con le condizioni di esposizione reale: infatti, il modello più probabile è rappresentato dall'assunzione di residui multipli presenti nei diversi componenti nella dieta, sia pure a livelli verosimilmente bassi. Il progetto si propone quindi di identificare eventuali fenomeni di interazione tra pesticidi le cui co-presenze nella dieta siano state già individuate nel Rapporto Annuale del Ministero della Salute.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati saranno 1) identificazione di fattori metabolici di suscettibilità per alcuni pesticidi. Gli enzimi identificati potranno essere utilizzati come biomarcatori di suscettibilità in studi di popolazione mirati 2) identificazione di eventuali meccanismi di suscettibilità legata 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 infantile. 3) individuazione di fenomeni di interazioni metaboliche tra pesticidi in condizioni di esposizione reale (sia rispetto alle dosi che alla possibilità di esposizione combinata).

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 sia degli operatori agricoli che della popolazione generale esposta ai residui negli alimenti o nelle bevande. I risultati potranno perciò essere trasferiti sia a livello Nazionale (es: Commissione Consulativa per i Prodotti Fitosanitari, di cui il responsabile è membro) che Internazionale (es. UE e 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 tipo epidemiologico molecolare per l'individuazione di gruppi di popolazione a maggior rischio e approntare adeguati piani di prevenzione.

**Impatto sulla salute di particolari condizioni ambientali e di lavoro, di provvedimenti di pianificazione territoriale” – Sottoprogetto:
Studio epidemiologico di mortalità per cause tumorali nell'area ad elevato rischio di crisi ambientale di Taranto**

Un problema centrale in epidemiologia ambientale è valutare gli effetti sulla salute di fonti puntiformi di emissione di agenti inquinanti in un dato territorio. A questo fine si è avviato nel comune di Taranto (sito di interesse nazionale per le bonifiche) uno studio caso controllo sulla distribuzione spaziale dei casi di tumore di diverse sedi in relazione alla residenza in prossimità del polo siderurgico, della raffineria, del cementificio, dei cantieri navali e dell'arsenale.

Risultati attesi nel triennio

I risultati dello studio (stima del rischio associato alla distanza fra la residenza dei casi delle varie patologie e i siti industriali in esame) forniranno elementi utili per l'individuazione delle priorità del monitoraggio degli inquinanti ambientali e del risanamento dell'area.

Trasferibilità dei risultati

La procedura messa a punto per questo studio è applicabile negli altri siti di interesse nazionale per le bonifiche caratterizzati dalla presenza di aree industriali inserite nei contesti urbani. La trasferibilità della procedura è in particolare prefigurabile nell'ambito dell'assistenza tecnica alle Regioni Ob. 1 per i fondi strutturali dei paesi dell'Unione Europea, a questo fine sono stati avviati contatti con l'Organizzazione Mondiale della Sanità - Regione Europa.

Inchiestri utilizzati nel settore dei materiali a contatto con alimenti: Identificazione di sostanze migrabili e potenziale di contaminazione degli alimenti

È previsto lo studio sulla composizione delle più comuni formulazioni per inchiostri utilizzati nei materiali a contatto con alimenti. Verranno poi analizzate diverse tecnologie per individuare per quali sostanze e in quali condizioni possa verificarsi una contaminazione dell'alimento.

Risultati attesi nel triennio

Approfondimento scientifico delle conoscenze sulla potenziale contaminazione di alimenti derivante dall'uso di inchiostri da stampa.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, contributo tecnico allo sviluppo di normative specifiche.

Indagine AMR (Approccio Multi-Rischio) per lo studio dei comportamenti a rischio di incidente degli adolescenti

Con l'impiego della tecnica AMR (Approccio Multi-Rischio) vengono studiati i fattori di rischio per incidenti/traumi dei giovani, collegando gli aspetti accidentologici a numerosi altri aspetti, particolarmente di carattere socio-comportamentale. La storia traumatologica dei rispondenti viene così collegata con numerose variabili di contesto, quali i rapporti con la scuola e con la famiglia, i rapporti con altri coetanei, l'attività fisica, le abitudini alimentari, l'uso di tabacco, alcol e sostanze, il comportamento su strada, e altro ancora. Lo strumento applicativo della tecnica AMR è costituito da un questionario autosomministrato, periodicamente sottoposto a studenti delle scuole superiori di tutte le regioni, secondo un apposito protocollo messo a punto dall'ISS. Il campione delle scuole è un campione stratificato di grandi dimensioni (l'ultima AMR ha coinvolto più di 25.000 studenti). L'attuazione dell'indagine su territorio viene svolta in collaborazione con i dipartimenti di prevenzione delle ASL.

Risultati attesi nel triennio

Va immediatamente sottolineato che pur essendo i risultati principali relativi ai fattori di rischio per la sicurezza, in particolare quella stradale, e loro relazioni, la tecnica AMR permette di ottenere preziose informazioni su altre importanti aree-problema, talune di grande rilievo per la salute (ad es. si hanno risultati sull'uso del tabacco, dell'alcol e delle sostanze tra i giovani). I risultati, anche grazie al disegno campionario e alle dimensioni dello stesso campione, sono particolarmente accurati e rappresentativi (ad. es. i risultati relativi all'uso delle droghe appaiono praticamente sovrapponibili a quelli ottenuti da indagini nazionali su questa tematica).

La periodicità (in genere triennale) di ripetizione dell'indagine permette, inoltre, di monitorare i cambiamenti che intervengono nelle conoscenze, negli atteggiamenti, nei

comportamenti dei giovani, come pure cambiamenti del contesto e delle abitudini, siano esse legate agli aspetti di interesse accidentologico o meno.

Trasferibilità dei risultati

I risultati che si ottengono con la tecnica AMR hanno un'alta valenza di trasferibilità sia in termini di informazioni generali, sia in termini di esigenze conoscitive dei singoli territori. Va sottolineato ancora una volta come questa "trasferibilità" non riguardi soltanto l'area specifica della traumatologia (sia come conoscenza sia come prevenzione), ma anche numerose altre aree direttamente connesse con la salute fisica e mentale dei giovani.

I risultati ottenuti dalle indagini precedentemente attuate sono stati ampiamente utilizzati sia dai mass media per campagne informative sulla sicurezza, sia da diverse regioni su problematiche giovanili.

Indagine relativa all'individuazione di contaminanti organici in matrici ambientali

L'uso di sostanze chimiche organiche per uso industriale e agricolo (antiparassitari), risulta nella contaminazione dell'ambiente dove tali sostanze tendono a persistere, in particolare nei comparti come suolo, sedimenti e fanghi di scarico.

La normativa nazionale (DM 25 ottobre 1999 n. 471), in materia di procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del DL.vo 5 febbraio 1997, n. 22 e successive modifiche e integrazioni, fissa i valori di concentrazione limite accettabile per i composti quali esaclorobenzene (HCB), pentaclorofenolo (PCP), dicloroisopropilene (DCIP), atrazina, alachlor, nitrobenzeni e clorobenzeni. A causa della tossicità e persistenza delle suddette sostanze, è necessaria una verifica della loro presenza o meno su substrati come suolo, sedimenti e fanghi di scarico.

Da ciò ne deriva la necessità di sviluppare metodi di determinazione analitica tali da permettere la rivelazione dei suddetti composti a livello di tracce e tali da garantire il recupero delle sostanze più volatili. Infatti, i metodi in uso propongono tecniche di analisi che implicano più stadi di estrazione portando così alla perdita dei composti volatili come HCB e DCIP.

Il progetto si propone di sviluppare metodi analitici innovativi per la determinazione simultanea dei contaminanti sopra descritti. Particolare attenzione viene rivolta all'uso di tecniche di estrazione automatizzate che permettono di analizzare più campioni contemporaneamente utilizzando volumi ridotti di solvente ed evitando la perdita di composti più volatili. Inoltre, la necessità di dover determinare i composti a livello di tracce richiede processi di arricchimento dell'estratto che necessariamente dovranno essere sviluppati in funzione delle caratteristiche chimico fisiche degli analiti.

Risultati attesi nel triennio

Nella prima fase del progetto, è previsto lo studio, da dati di letteratura, delle proprietà chimico fisiche degli analiti e la loro interazione con i substrati in esame. Altresì, verrà effettuata una ricerca per verificare la presenza di metodi attualmente in uso (letteratura, EPA, AOAC).

Successivamente, verranno sviluppati metodi analitici idonei all'analisi simultanea delle diverse classi di composti (antiparassitari, clorobenzeni, nitrobenzeni, ecc.).

Si procederà, poi, alla valutazione delle prestazioni dei metodi proposti in termini di recupero, accuratezza e precisione. Inoltre, per la verifica delle prestazioni del metodo, lo stesso procedimento si applicherà a materiali di riferimento, se disponibili, per le classi di composti analizzati.

Infine, il metodo sviluppato, se idoneo, verrà applicato all'analisi di campioni di fanghi, sedimenti e terreni provenienti da diversi possibili siti contaminati.

Trasferibilità dei risultati

In collaborazione con il Ministero dell'Ambiente verrà effettuata un'indagine su possibili siti contaminati dalle sostanze descritte.

Indagine sulla presenza di adenovirus e norovirus nelle acque reflue mediante metodiche molecolari

Esiste attualmente un enorme interesse nella comunità europea per adeguare e standardizzare i criteri di valutazione della qualità delle acque. I nuovi criteri sono basati sui requisiti di rapidità offerti dalle tecnologie molecolari che utilizzano la *Real Time* o PCR quantitativa (QPCR) per la quantificazione del rischio virale. Gli *adenovirus* e *norovirus* umani sono stati proposti come nuovi parametri, in aggiunta o in sostituzione dell'attuale parametro *enterovirus*, nei giudizi di qualità delle acque di balneazione. I *norovirus*, contrariamente agli *adenovirus* e *enterovirus*, non sono coltivabili e quindi sono identificabili solo mediante metodiche molecolari. Contrariamente ad altri paesi europei, non esistono sufficienti dati italiani sulla circolazione a livello ambientale di questi virus. A questa carenza si aggiunge anche l'assoluta mancanza di dati sulle potenziali interferenze diagnostiche dovute ad *adenovirus* e *norovirus* di origine animale. Le acque reflue sono la matrice ideale per lo studio di questi virus. Grazie alla disponibilità dell'Arpalazio, verranno effettuati dei prelievi mensili nelle acque reflue in uscita e entrata dei depuratori di Roma-Sud e Roma-Ostia. Sugli acidi nucleici purificati verrà effettuata l'identificazione mediante PCR, *RealTime* PCR e analisi delle sequenze nucleotidiche per l'identificazione di ricombinanti genetici uomo-animale.

Lo studio verrà completato con una analisi comparativa basata su: a) ceppi di collezione di *adenovirus* derivanti dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, b) ceppi identificati in campioni fecali forniti dalla Clinica Pediatrica dell'Università La Sapienza di Roma, ceppi di *adenovirus* di origine animale (bovini e suini) forniti dall'IZS della Sicilia

Risultati attesi nel triennio

Si disporrà dei primi dati italiani sulla circolazione di questi virus nell'ambiente in modo da valutare con cognizione di causa la necessità o meno di introdurre nuovi e costosi parametri nei giudizi di qualità dell'acqua,

Gli *adenovirus*, che crescono su colture cellulari, verranno anche isolati su linee cellulari Hep2 e Vero in modo da costituire una *repository* cioè una banca biologica a scopo diagnostico. Ciò consentirà di valutare appieno le potenzialità delle linee cellulari A549 attualmente in fase di valutazione comunitaria nei protocolli di identificazione dei virus nelle acque di balneazione.

I *norovirus*, che non crescono su linee cellulari, verranno parzialmente clonati in vettori plasmidici in modo da costituire un archivio biologico di standard di DNA. Ciò permetterà di sviluppare in futuro tecniche di *microarray* per l'analisi multipla di questi patogeni nei campioni ambientali.

Un altro importante aspetto sarà la valutazione dell'esistenza o meno di interferenze diagnostiche dovute ai virus di origine animale.

Trasferibilità dei risultati

I protocolli diagnostici saranno semplificati e standardizzati per il trasferimento alle Agenzie Regionali di Protezione Ambientale. L'identificazione qualitativa e quantitativa comporterà l'allestimento dei protocolli di niste PCR e l'uso dello IAC (*Internal Amplification Control*) in sinergia con le esigenze comunitarie di unificazione dei metodi e la loro relativa certificazione. L'identificazione qualitativa e quantitativa mediante *RealTime* comporterà la disponibilità di *standard* di DNA per la costruzione delle curve di taratura indispensabili per l'esecuzione del saggio. Soprattutto per i *norovirus*, ove non esiste la possibilità di acquistare gli *standard*, si

disporrà di materiali *ad hoc* che consentiranno agli organi regionali l'esecuzione del saggio diagnostico. Tale saggio è attualmente quasi impossibile per la mancanza di *standard* positivi.

Indagine sulle nuove sorgenti emissive di microinquinanti *indoor*, con particolare riguardo ai mezzi di trasporto

L'esposizione umana negli ambienti interni è maggiore rispetto a quella esterna per molte sostanze. Tra queste si ritrovano, ad esempio, composti organoalogenati di vecchia e di nuova produzione.

In particolare, gli apparecchi elettronici (PC, stampanti, fax, TV e HIFI) determinano concentrazioni crescenti di ritardanti di fiamma. Sembra ormai accertato che l'esposizione a queste sostanze sia prevalentemente inalatoria e che avvenga in ambienti interni.

Parallelamente, la presenza *indoor* di alcuni contaminanti residui derivanti da vecchi materiali e apparecchi è ancora notevolmente superiore rispetto ai livelli *outdoor*.

Infine, l'uso sempre più esteso di nuovi materiali sintetici negli abitacoli dei mezzi di trasporto, sia pubblici che privati, può provocare l'emissione di notevoli quantità di ritardanti di fiamma e altri composti; a questi si aggiunge la possibile immissione nell'abitacolo dei composti generati dalla combustione dei carburanti.

Sebbene l'esposizione sui mezzi di trasporto sia, per la popolazione generale, poco rilevante, per diversi segmenti di popolazione essa può incidere in maniera consistente, specie se i livelli dei contaminanti sono elevati.

Diventa quindi rilevante condurre un'indagine complementare sui livelli che si possono misurare nell'aria di vari mezzi di trasporto.

Si propone uno studio sui livelli attualmente presenti in ambienti di vita di microcontaminanti organici di vecchia e di nuova generazione, con particolare attenzione alle nuove fonti emissive.

A corredo, tramite nuovi metodi analitici, si indagherà sulla rapporto *indoor/outdoor* di alcuni congeneri indicatori.

Risultati attesi nel triennio

Aggiornamento dei metodi per la determinazione dei microcontaminanti organici ad elevata persistenza e tossicità nell'aria; verrà in particolare introdotto un metodo basato sulla segnatura chirale di alcuni congeneri.

Informazione sui livelli di contaminazione *indoor* per nuovi contaminanti

Indicazioni sulla provenienza degli inquinanti con possibilità di indirizzo degli interventi preventivi.

Indagini microbiologiche su acque di impianti di acquacoltura

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.

Risultati attesi nel triennio

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

Trasferibilità dei risultati

Linee guida e pubblicazioni

IZS Mezzogiorno - Ricerca Corrente 2004 - Sviluppo e validazione di metodi di prova di *screening* e conferma per la determinazione di microcistine in alimenti e tessuti di origine animale

Documentazione bibliografica sul problema delle microcistine e dei metodi di rilevazione.

Raccolta di campioni da analizzare per la presenza di microcistine.

Sviluppo di metodi di conferma in LC-MS/MS, validazione e reazione dei relativi protocolli operativi.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dei risultati, studio delle possibili correlazioni tra contaminazione algale e livelli di microcistine nei campioni analizzati.

Trasferibilità dei risultati

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

Lo studio dei comportamenti e degli stili di vita della popolazione generale ai fini della valutazione dell'esposizione ad inquinanti ambientali per la prevenzione e mitigazione dei danni per la salute

Lo studio è il proseguimento di attività di ricerca volte ad analizzare i comportamenti e gli stili di vita della popolazione generale al fine di valutare l'esposizione ad inquinanti ambientali. La ricerca si basa sulla rilevazione di attività giornaliere, tempi impiegati nelle diverse attività, luoghi *indoor* e *outdoor* frequentati, mezzi di trasporto utilizzati, per gruppi sesso e età-specifici, per la durata di una settimana e in periodi stagionali diversi. Inoltre, vengono rilevati i comportamenti e le abitudini alimentari delle medesime popolazioni. La metodologia applicata è l'indagine campionaria di popolazione con questionari e diari settimanali. La metodologia consente di applicare tecniche di analisi stocastica in grado di evidenziare l'ampia variabilità di comportamento esistente tra individui di uno stesso gruppo e tra popolazioni differenti, sia di apprezzare i contributi di specifici comportamenti alla magnitudo dell'esposizione. Particolare attenzione viene posta su gruppi sensibili, in particolare bambini e adolescenti i cui comportamenti, in associazione con la specifica vulnerabilità biologica, possono configurare situazione di rischio più elevato.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio consentirà di descrivere i pattern giornalieri di attività e di comportamento di tutti i gruppi di popolazione analizzati, per sesso e età, evidenziando le differenze esistenti sia tra gruppi differenti, sia tra individui dello stesso gruppo. Lo studio consente di effettuare una valutazione aggregata dell'esposizione, evidenziando per specifici inquinanti i contributi delle diverse vie espositive. I dati raccolti andranno ad integrare il database sui comportamenti della popolazione italiana, già esistente presso il gruppo di ricerca ISS.

Trasferibilità dei risultati

Costruzione dei parametri atti a descrivere gli individui-tipo della popolazione italiana, residenti in aree geografiche diverse e con differenti abitudini e culture, al fine di integrare le valutazioni di esposizione ad inquinamento. L'utilizzo di tali parametri è finalizzata ad effettuare valutazioni di rischio più aderenti alle specifiche caratteristiche della popolazione italiana e fornendo supporto alla decisione per la prevenzione e riduzione dei rischi per la salute connessi ad inquinamento ambientale.

Lo studio dei comportamenti e delle abitudini dei cittadini ferraresi ai fini della valutazione dell'esposizione a contaminazione ambientale

Il progetto si propone di studiare i comportamenti e le abitudini tramite indagini su un campione rappresentativo di popolazione utilizzando questionari e diari individuali al fine di quantificare la variabilità, nei diversi gruppi età-sesso, nel consumo degli alimenti. L'analisi dei dati raccolti sarà condotta con tecniche probabilistiche al fine di sviluppare un modello d'esposizione in grado di quantificare la variabilità delle stime e di fornire un contributo ai processi di mitigazione dell'esposizione e del rischio.

I risultati di questo studio saranno quindi integrati con quelli ottenuti da uno studio precedente, condotto nella stessa area, finalizzato alla valutazione dell'esposizione per via inalatoria ad inquinanti atmosferici. Il confronto consentirà di valutare il contributo delle diverse vie d'esposizione ad inquinanti presenti nei diversi media.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio consentirà di descrivere i *patterns* d'esposizione ingestiva per i diversi gruppi di popolazione, di quantificare la variabilità dei consumi per specifici alimenti per i diversi gruppi, di evidenziare gruppi di popolazione a rischio per specifici comportamenti, di stimare il contributo della via ingestiva rispetto a quella inalatoria per alcuni specifici inquinanti contenuti sia nell'aria sia negli alimenti.

Trasferibilità dei risultati

Messa a punto di una metodologia di analisi dell'esposizione ai fini della protezione della salute umana.

Materiali e soluzioni innovative per imballaggio alimentare

La ricerca è pianificata per lo studio di nuovi tipi di imballaggi: a) biodegradabili; b) riciclati; c) con presenza di barriere funzionali. Vengono presi in considerazione aspetti di migrabilità e compatibilità con diverse classi di alimenti.

Risultati attesi nel triennio

Approfondimenti scientifici e tecnici sulla compatibilità igienico-sanitaria delle soluzioni innovative con gli alimenti.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, linee guida

Metodi e modelli per l'informazione della popolazione generale esposta agli effetti avversi indotti da fattori di rischio presenti nell'ambiente di vita e di lavoro

L'attività di ricerca nel settore dell'informazione ed educazione sui rischi ambientali si pone in prospettiva come obiettivo generale la proposizione di modelli e strumenti operativi per la diffusione di una corretta consapevolezza del rischio e delle informazioni relative a comportamenti e misure di protezione atte a ridurre gli effetti del fattore di rischio sulla salute. Allo stato attuale il dibattito nei paesi della comunità europea verte sulla predisposizione di linee guida, sia per quanto attiene la definizione di criteri generali per la *risk communication*, sia per la predisposizione di modelli e procedure per l'informazione su specifiche problematiche di rischio (inquinamento dell'ambiente di vita e di lavoro, degli alimenti, ecc.). Particolare attenzione è dedicata alla problematica del rischio di incidente chimico rilevante in impianti industriali per il quale vengono in continuazione aggiornate le norme specifiche che regolamentano la diffusione alla popolazione esposta delle informazioni sul rischio e sui

comportamenti da adottare in caso di incidente chimico (DPR 175/88, Legge 137/97, DL.vo. 334/99).

Altri obiettivi di interesse dell'ISS presenti nel dibattito attuale in campo internazionale riguardano la valutazione di efficacia delle linee guida emanate per l'informazione dei lavoratori professionalmente esposti ad antiblastici, la messa a punto di strategie di educazione alimentare per adolescenti; lo studio dei comportamenti e degli stili di vita in popolazioni esposte ad inquinanti ambientali connessi ad attività industriali.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio il risultato che si intende perseguire è:

Lo sviluppo di una metodologia per la valutazione dell'efficacia di iniziative informative e di educazione sanitaria condotte su gruppi esposti a rischi professionali (antiblastici in ambiente ospedaliero) e a rischi presenti nell'ambiente di vita (rischi chimici rilevanti, inquinamento atmosferico, ecc.);

la definizione di modelli di intervento per la protezione dei lavoratori o di gruppi di popolazione esposti a specifici rischi attraverso lo sviluppo di strumenti informativi idonei (alimentazione e adolescenti).

Monitoraggio ambientale a Casapesenna (Caserta)

In un primo studio a carattere ambientale ed epidemiologico condotto da questo Istituto negli anni 2001-2002 è stato evidenziale nel Comune di Casapesenna (Caserta) un eccesso di mortalità per malformazioni congenite, rispetto alla mortalità della Regione Campania (SMR maggiore di 100). Ciò ha portato le autorità sanitarie locali (Sindaco e AUSL) a incentivare la predisposizione di uno studio di maggior dettaglio da condurre nell'area del Comune di Casapesenna.

La ricerca che è stata già avviata nel 2005 e proseguirà fino al 2007 ha come obiettivo principale quello di caratterizzare lo stato di qualità ambientale (aria, acqua, suolo) del Comune di Casapesenna, anche attraverso l'uso di bioindicatori (muschi indigeni e/o trapiantati).

L'area comunale è stata preventivamente studiata in termini di "forzanti" presenti anche nei Comuni limitrofi a Casapesenna (impianti smaltimento/trattamento rifiuti, industrie, impianti trattamento acque reflue, utilizzo sul suolo di fanghi, allevamenti, ecc.) quindi è stato costruito il "modello concettuale" dell'area di interesse al fine di programmare le future azioni di monitoraggio delle varie matrici ambientali.

Contestualmente verranno effettuati approfondimenti sui dati sanitari (studi epidemiologici).

Risultati attesi nel triennio

Ove possibile si dovrà individuare l'eventuale nesso causale tra stato di salute della popolazione residente nel Comune di Casapesenna e stato della qualità ambientale delle matrici suolo, aria, acqua, queste ultime influenzate anche dalla presenza di impianti di trattamento/smaltimento rifiuti in comuni vicini a quello di Casapesenna.

Trasferibilità dei risultati

Essendo l'area di interesse di dimensioni limitate, sarà possibile pervenire alla predisposizione di specifici protocolli per:

- le modalità di campionamento e caratterizzazione di matrici ambientali per una area vasta, quale quella di un intero comune;
- le modalità di conduzione di uno studio sia a carattere ambientale che sanitario;
- le modalità di comunicazione del dato sanitario e ambientale della popolazione

Network of molecular epidemiology of cancer in Italy (2005-2006)

Gli obiettivi principali di questo *Network* (coordinatore Dr Franco Merletti, Università di Torino) sono: (a) creare una rete di ricercatori coinvolti nell'identificazione di interazioni rilevanti tra geni e ambiente attraverso studi di epidemiologia molecolare in Italia; (b) migliorare la qualità delle misure di laboratorio identificando laboratori di riferimento ; (c) mettere insieme dati esistenti ; (d) creare un *web site* di questa rete nazionale. Il nostro contributo verte principalmente sull'analisi funzionale di polimorfismi nei geni della riparazione del DNA. Inoltre, siamo coinvolti nello sviluppo di nuovi saggi per l'analisi dell'attività di riparazione di cellule umane che siano adattabili ad *high-throughput screening*. In particolare, stiamo sviluppando saggi basati sull'uso di tecniche di *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS). La capacità del FCS di quantificare interazioni molecolari a concentrazioni nanomolari ne fa un nuovo e promettente strumento per identificare variazioni nella capacità di riparazione nella popolazione generale.

Risultati attesi nel triennio

Questo studio permetterà di definire l'importanza funzionale di polimorfismi genetici comuni nella popolazione. Inoltre, permetterà lo sviluppo di nuovi saggi funzionali per monitorare la capacità di riparazione adatti per *high-throughput screening*.

Trasferibilità dei risultati

I risultati scientifici verranno condivisi con la comunità scientifica interessata attraverso il sito web del *Network* e pubblicazioni scientifiche internazionali. Inoltre, lo sviluppo di nuovo saggi è di potenziale interesse industriale.

Osservatorio acqua e salute

Obiettivi specifici:

1. Obiettivo specifico: Migliorare il sistema informativo del Ministero della Salute.
2. Obiettivo specifico: Promuovere un sistema di qualità dei dati
3. Obiettivo specifico: Sorvegliare i rischi associati alla qualità delle acque.

In particolare, il raggiungimento del terzo obiettivo riguarda la promozione di un sistema di sorveglianza delle patologie trasmesse dall'acqua, in riferimento ai fattori di rischio prioritari (microrganismi patogeni, cianobatteri, agenti chimici), attraverso il miglioramento del sistema di raccolta e notifica dei dati pertinenti, facendo riferimento alle raccomandazioni di organizzazioni internazionali.

Questa attività include anche l'avvio della sorveglianza sui cianobatteri, ritenuti microrganismi patogeni emergenti dall'OMS e dall'OCSE. Ad oggi nel nostro Paese non è possibile definire su scala nazionale questo problema. Non sono noti in modo esauriente, a livello nazionale, i corpi idrici interessati da fioriture, le cui acque vengono utilizzate per scopo potabile o per lo svolgimento di attività ricreative.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione delle aree di maggiore criticità in relazione al problema esaminato.

Sviluppo di un sistema informativo nazionale sulle problematiche affrontate

Sviluppo di un sistema di sorveglianza nazionale sulle patologie associate alla qualità delle acque

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche

Messa in rete dei dati e delle informazioni su scala nazionale riguardanti il problema oggetto del progetto

Elaborazione di linee guida

Oxidative DNA damage in human primary skin cells: mechanisms and implications for carcinogenesis

Il progetto è focalizzato sull'analisi del ruolo del danno ossidativo nello sviluppo di tumori della pelle. A questo scopo si utilizza come sistema cellulare modello cheratinociti umani primari derivati da donatori normali o affetti da xeroderma pigmentosum (XP), una malattia genetica causata da difetti nella riparazione del DNA e associata con alta incidenza di cancro della pelle. I cheratinociti sono le cellule bersaglio per la maggior parte dei tumori della pelle associati ad esposizione a luce solare e il programma di differenziamento così come quello di senescenza replicativa possono essere indotti in questo sistema cellulare cambiando le condizioni di coltura. Le domande importanti a cui intendiamo rispondere sono le seguenti: 1) Qual è la risposta al danno ossidativo nelle cellule bersaglio per i tumori della pelle?; 2) Come alterazioni nella riparazione del DNA, in particolare nella riparazione *Nucleotide Excision Repair* (difettiva in cellule XP), influenzano la risposta al danno ossidativo?; 3) Qual è l'effetto del danno ossidativo in sequenze non codificanti (promotori e telomeri)?; 4) Come sono regolati l'induzione di danno ossidativo e la sua riparazione quando avviene il *switch* tra crescita e differenziamento?; 5) Come sono regolati l'induzione di danno ossidativo e la sua riparazione quando i cheratinociti entrano in uno stadio non-proliferativo di senescenza replicativa?

Risultati attesi nel triennio

La conoscenza derivata da questo studio, insieme alle attuali conoscenze, dovrebbe chiarire il ruolo del danno ossidativo nelle cellule bersaglio per i tumori della pelle.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni derivate da questo studio permetteranno di assistere i pazienti affetti da *xeroderma pigmentosum* nella prevenzione e nella cura e, più in generale, forniranno una migliore comprensione del ruolo svolto da difetti nella riparazione del danno ossidativo nello sviluppo dei tumori della pelle nella popolazione generale.

Preparazioni a base di piante officinali: attività bioconservante e antimicrobica (continuazione di un progetto precedente finanziato; proposta di continuazione dello stesso nel triennio 2006-2008)

L'ambiente, i mezzi di trasporto, le interazioni umane e animali, e particolarmente la migrazione degli uccelli, favoriscono l'ubiquitarità e la diffusione dei microrganismi in ogni comparto ambientale. La recrudescenza di malattie che si credevano risolte e le nuove malattie emergenti (SARS, HIV, influenza aviaria, malaria, tubercolosi) richiedono interventi sanitari e soluzioni terapeutiche in continua evoluzione. I fenomeni di farmaco-resistenza dovuti all'uso, ma anche all'abuso di antibiotici e alla capacità difensiva e adattativa degli stessi microrganismi nei confronti dei farmaci per uso umano e veterinario sono un altro aspetto dell'esigenza attuale di nuove molecole efficaci o comunque alternative alla normale terapia antibiotica. I ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) o di resistenza intermedia ai glicopeptidi (GISA), i ceppi di *Candida* resistenti agli azolici, sono gli esempi tra i più critici.

In aggiunta a ciò, i microrganismi, opportunisti e/o patogeni per l'uomo e per l'animale, presenti nell'ambiente sono una potenziale causa di fenomeni di alterazione e di contaminazione di prodotti finiti di largo consumo (ad esempio, alimenti, mangimi, medicinali, cosmetici, prodotti personali e per l'ambiente). La soluzione adottata per prevenire questi fenomeni è prevalentemente quella dell'uso di conservanti di sintesi, capaci di impedire la proliferazione microbica e quindi l'alterazione dei prodotti. D'altro canto è opportuno considerare che l'uso di questi additivi, pur nel rispetto dei limiti quantitativi previsti dalle specifiche normative vigenti dei prodotti in commercio, potrebbe essere causa di rischi per l'uomo, tra cui manifestazioni allergiche.

Questo progetto di ricerca ha lo scopo di valutare l'efficacia e la possibilità d'impiego terapeutico di sostanze naturali e loro preparati, dimostratisi attivi nei confronti di microrganismi opportunistici e/o patogeni per l'uomo e l'animale. Nell'uomo ciò potrebbe trovare applicazione particolarmente in quelle aree corporee facilmente soggette a colonizzazioni da parte di agenti microbici patogeni o opportunisti (per esempio, cute e mucose). In veterinaria i trattamenti antimastite potrebbero essere un'ulteriore applicazione per ridurre l'uso di antibiotici e quindi i fenomeni di antibiotico resistenza da uso non umano di antibiotici, come raccomandato principalmente da WHO, FAO e *Codex Alimentarius*.

Altro obiettivo importante del progetto è lo studio dell'uso bioconservante in prodotti di largo consumo umano e delle possibili applicazioni degli oli essenziali in igiene ambientale. A quest'ultimo riguardo si segnalano due possibili interventi. Il primo riguarda lo studio dell'attività nei confronti della Legionella, microrganismo presente nell'ambiente acquatico naturale e artificiale che è causa nell'uomo di una grave forma di polmonite ad elevata mortalità; fonte di infezione sono gli *aerosol* contenenti Legionella (principali sistemi generanti aerosols associati alla trasmissione della malattia: impianti idrici, impianti di climatizzazione dell'aria – torri di raffreddamento, sistemi di ventilazione e condizionamento dell'aria – apparecchiature per la respirazione assistita, idromassaggi, siringhe aria-acqua dei riuniti dei dentisti). Il secondo riguarda lo studio dell'azione acaricida e acarorepellente contro le ninfe di *Ixodes ricinus*.

Il mondo scientifico è sempre più rivolto a sperimentare i prodotti naturali e/o nuove molecole di origine vegetale dotate di proprietà antimicrobiche. Le evidenze al riguardo oramai appaiono nella letteratura internazionale con una certa frequenza e anche i proponenti di questa ricerca da anni lavorano in questa direzione con risultati già pubblicati e promettenti tali da stimolare sviluppi ulteriori con il progetto in questione.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nel precedente progetto di ricerca, e in parte già pubblicati e presentati a congressi nazionali e internazionali, sono ancora in corso di elaborazione per essere pubblicati. Sono attesi approfondimenti ulteriori per quanto riguarda: l'attività inibente dell'olio essenziale di *melaleuca alternifolia* (TTO) nei confronti di ceppi batterici di collezione e isolati da campioni clinici; l'attività antifungina di TTO nei confronti di isolati clinici, principalmente di *Candida* provenienti da tamponi orofaringei di pazienti HIV-sieropositivi; l'attività anticandida di TTO *in vivo* in ratte infettate con un ceppo altamente vaginopatico utilizzando un modello sperimentale accettato per essere molto stringente e predittivo della terapia della vaginite da *Candida* nelle donne; l'attività anti-legionella e l'attività acaricida e acarorepellente per inalazione e per contatto di ninfe di *Ixodes ricinus*. Come supporto delle ricerche biologiche predette saranno svolti studi di composizione chimica di TTO, particolarmente per quanto riguarda la stabilità nel tempo. A ciò si aggiungeranno studi di composizione di altri oli essenziali a prevalente contenuto fenolico e/o alcolico così da ipotizzarne una possibile attività antibatterica e antimicotica da verificare sperimentalmente e in confronto con quelle di TTO da assumere con olio di elezione e di confronto. Al fine di verificare la presenza o meno di sostanze tossiche o allergizzanti nelle droghe vegetali e nelle loro preparazioni saranno avviati studi fitochimici utilizzando idonee metodiche strumentali (GC-FID; GC-MS; SPME-HS). A tale riguardo saranno avviate anche culture di piante per verificarne il chemiotipo utilizzando la serra sperimentale e altri locali dei giardini dell'ISS.

Trasferibilità dei risultati

Le attività antimicrobiche evidenziate per il TTO o di altri oli essenziali potranno essere valutate ai fini di una loro possibile applicazione di tipo bioconservante o preventiva in campo alimentare, particolarmente in quei prodotti preferenzialmente soggetti a deterioramento da lieviti e muffe. L'attività antibatterica e antifungina studiata suggerisce possibili applicazioni in

ambito terapeutico e come possibile alternativa nei casi di uso o abuso di antibiotici (d'uso umano e veterinario) che si accompagnano a fenomeni di farmaco-resistenza. L'azione igienizzante e disinfettante ambientale nei confronti di *Legionella*, di *Candida* e di ninfe di *Ixodes ricinus* sembrerebbero di promettente interesse in ambito industriale per la progettazione di prodotti di consumo.

Produzioni zootecniche biologiche: studio, sperimentazione e applicazione di strumenti per la georeferenziazione e la certificazione territoriale di distretti biologici

Vengono presi in considerazione diverse tipologie di allevamenti biologici sia di aziende di allevamento tradizionale, principalmente ovini, bovini, suini e altresì allevamenti di prodotti ittici, per i quali mancano completamente riferimenti anche nell'unico documento normativo di riferimento rappresentato dal regolamento CE 1804/99.

Sulla realtà territoriale sulla quale insistono gli allevamenti selezionati vengono forniti dati, informazioni e implementati sistemi di lavoro, atti a definire la situazione ambientale complessiva del distretto o dei distretti oggetto di studio, e finalizzati alla georeferenziazione, cioè alla individuazione del distretto nel contesto geografico considerato, e al riconoscimento di sistemi di certificazione territoriale del distretto stesso.

Verranno quindi effettuate indagini relative ad aspetti di sicurezza alimentare, di qualità ecologico-ambientale, sanitari, zootecnici, gestionali e verranno forniti indicatori, arricchiti dall'applicazione della statistica spaziale, da inserire nel GIS per la realizzazione di mappe che racchiudano, sintetizzano e rendano immediatamente evidente la situazione territoriale del distretto considerato e la qualità delle produzioni biologiche sia rispetto agli animali stessi che ai prodotti.

Pertanto per gli aspetti relativi alla sicurezza alimentare sia animali che prodotti di origine animale verranno caratterizzati dall'indagine per la accidentale presenza di contaminanti e di eventuali residui di farmaci. Caratterizzanti risulteranno inoltre le indagini relative alla presenza di OGM.

Si prevede inoltre su matrici ambientali l'effettuazione della determinazione di contaminanti (metalli pesanti, pesticidi, diossine, PCBs), farmaci, *disruptors*, indagini sullo stato e sull'impatto dei reflui aziendali, applicazione di indici biotici e di saggi biologici e la determinazione su matrici biologiche di *biomarkers* di stress e di esposizione agli inquinanti ambientali che consentono di fornire preziose informazioni sul livello di benessere animale nei confronti della qualità ambientale del distretto considerato e che possano rappresentare anche validi parametri di certificazione territoriale.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione tossicologiche mediante studi di coorte georeferenziati, dell'esposizione ambientale a contaminanti tossici persistenti (diossine, PCB diossino-simili) in ovini, suini a stabulazione libera e correlazione dei livelli analitici con biomarcatori di esposizione attraverso parametri di benessere animale sia clinici (indici di fertilità, aborti, natimortalità, malformazioni) che biochimici (valutazione dello stress ossidativo, valutazione della funzionalità immunitaria), in collaborazione con le altre U.O.

Valutazione dei risultati e loro confronto con i dati consolidati nella letteratura scientifica, riferite a specie allevate sia in modo intensivo, che allo stato brado.

Trasferibilità dei risultati

Organizzazione di incontri per la diffusione dei risultati e delle metodologie applicative del progetto

Progetto europeo MICROSOURCE, Sixth Framework Programme- Specific Targeted Research Project. "The detection of Emerging Pathogen in Drinking Water Sources" Progetto tipo STREP. Submitted.

Micro-organisms in source water form a potential threat to public health. Water treatment and disinfection are designed to act as barriers to these organisms getting into the drinking water. For ground water the microbiological quality relies on protection of the catchment area on the surface with minimal treatment of the abstracted water, restricted usually to disinfection. Bottled water is usually abstracted from wells and springs and may also receive minimal treatment. Treatment remains constant irrespective of the quality of the water but the treatment may not always provide a barrier to micro-organisms.

Considered as food, water must fulfil all the quality parameters expected of any foodstuff harvested or manufactured for human consumption. Water is subjected to a wide range of quality expectations and governed by a range of regulations and directives. However, regulations can only cater for micro-organisms which are detectable in water by currently available technology and these are directed at organisms indicative of faecal pollution rather than those 'known to cause disease (i.e. pathogens)'. There remains a number of organisms which are detectable in water for which an association with disease is difficult to demonstrate and yet are sometimes associated with sporadic cases of illness, often through relatively poor evidence.

Recognition of these mechanisms is essential to devising a strategy to detect EPs in foods and in the environment.

Risultati attesi nel triennio

To review the health effects linked to consumption of water from a variety of source waters in different Member States (MS) in the EU.

To develop methods for the detection of Emergent Pathogens (EPs) in different types of source water. Laboratories will develop appropriate detection methods using a combination of methods available and their own expertise.

To carry out extended surveillance of selected source water types for target organisms. A surveillance programme will be instituted to investigate the incidence of target organisms in different source waters in Participants' countries. Surface waters will be monitored over a 12-month period, and ground waters will be monitored according to perceived risk events which may compromise the microbiological quality of the water.

To differentiate strains of micro-organisms It is important to know the origin of any potentially pathogenic micro-organisms detected during the surveillance stage. Technology now permits sophisticated source tracking and we will employ a range of methods based on different organisms to discriminate between human and different kinds of animal pollution.

To analyse faecal indicator data In parallel with surveillance for the target micro-organisms faecal indicator monitoring will be undertaken to determine a 'baseline' water quality for each site. Together with data on treatment and other parameters, it will be possible to perform a quantitative microbiological risk assessment (QMRA) for each water type and country.

Trasferibilità dei risultati

The selected methodology will provide a much firmer scientific basis for the surveillance of EPs in source waters in MS of the EU.

Methods developed in this Project should be capable of adoption by 'standard' microbiology laboratories to facilitate monitoring without the acquisition of expensive equipment or training of new personnel since methods will be selected taking into account limited expertise and equipment in routine monitoring laboratories. Not all methods need be adopted by all laboratories, rather it is anticipated that a suite of methods will be taken up by

laboratories/Member States in accordance with their perceived needs in monitoring for EPs peculiar to their own drinking water sources;

Environmental surveillance for EPs will provide important baseline data vital to inform management responses to, for example, disease associated with any of the target microorganisms. Clearly, an established system for EP monitoring in EU countries will avoid the delay that would be experienced if control measures are only adopted in emergency in response to outbreaks

Progetto europeo VIROBATHE, "Sixt Framework Programme- Specific Targeted Research Project. Methods For The Concentration And Detection Of Adenoviruses And Noroviruses In European Bathing Waters With Reference To The Revision Of The Bathing Water Directive 76/160/EEC"

Pollution of recreational waters by sewage produces a perceived public health problem in many EU Member States. Many States depend on tourism for much of their national income and a large part of the Gross Domestic Product (GDP) of the Mediterranean States in particular is derived from seasonal tourism around their coastlines; resorts developed since the 1960s expansion in human mobility have largely been around attractive maritime areas, and large economic centres now exist which are highly dependent on the tourist trade.

The Project will provide a combined concentration/detection procedure for the analysis of EU bathing waters for noroviruses and adenoviruses. This will be done by statistically validated comparisons of methods for processing of water samples to achieve the best virus recovery consistent with cost and feasibility of use in routine monitoring laboratories across the EU.

Comparisons will be done using standardised virus seeded into marine and fresh waters. Detection by (RT-) PCR and cell culture will be coupled with the concentration procedures to provide a combined technique. PCR products from sample concentrates will be sequenced and the data analysed to derive strain and serotype information.

The work addresses the research objectives directly through its relevance to the revision of the Bathing Water Directive 76/160/EEC.

The Project will be done by 16 Participant Laboratories of nine countries in close collaboration to derive a harmonised combined method.

Risultati attesi nel triennio

compare methods currently used in Community laboratories for the concentration and detection of noroviruses and adenoviruses in recreational waters;

derive a combination of concentration and detection techniques to provide an effective and reproducible system of testing recreational waters for the target viruses;

furnish scientific evidence, based on sound methodology, which will provide support for norovirus and adenovirus testing of environmental samples in respect of their role as the appropriate viral indicator of human faecal pollution;

prepare the technology for Accession States as part of the development of their environmental and social programmes and to share the technology between laboratories to achieve wider competence in the virological analysis of environmental materials.

Trasferibilità dei risultati

The data generated from the work will inform the current debate associated with the potential inclusion of a virus parameter in the Bathing Water Directive (CEC, 1994, 1997, 2000, 2002)

The current Consortium is well qualified to spearhead this task and the inclusion of Laboratories representative of the Accession States will ensure rapid dissemination to those and other States who wish to enhance the monitoring of their bathing waters

Progetto europeo ENVIRONET "A European Network for Environmental and Food Virology". Progetto tipo COST. Submitted

Environmental Virology is the study of viruses which can be transmitted through water, sewage, soil, air, fomites or food.

The origins of environmental virology lie in the work of Melnick and others who in the 1940s demonstrated that poliovirus could be detected in sewage. Subsequent studies showed that a variety of viruses shed from the intestines of healthy and ill individuals could be detected in a range of water types. Although the range of viruses detectable was largely confined to the enteroviruses and phage, many studies showed that these agents persist and survive in the environment longer than bacteria and are also resistant to disinfection. Further work in the late 1980s showed that shellfish harbour enteroviruses and phage and, more importantly, hepatitis A virus, even after depuration in fresh water, and that consumption of oysters and mussels grown in polluted water may constitute a hazard to human health.

Although work on enteroviruses provided much useful information on the behaviour of viruses in the environment, little work was done on the most important perceived hazard, the viruses of gastroenteritis, until the sequencing of the Norwalk virus genome in 1990 permitted the detection of this agent by the polymerase chain reaction. It is now possible to detect them and other enteric viruses not only in sewage but in polluted irrigation waters, drinking waters and contaminated foods.

Risultati attesi nel triennio

To establish systems for effective European responses to current and emerging viral hazards associated with food and environmental contamination.

To promote the production of the most effective analytical tools for food and environmental virological analysis. (WG2)

To gather information and knowledge on identification of environmental viruses and the implications of their presence for public health, and formulate systems to acquire optimal information from data on the prevalence of viruses in foodstuffs and environmental matrices. (WG3)

To evaluate the elimination and degradation characteristics of indicator targets able to model viral behaviour in different environmental matrices. (WG4)

To establish a program of short-term scientific missions, and exchanges between laboratories (a) to facilitate the transfer of knowledge and technical information from the more experienced laboratories to those wishing to increase their experience in food and environmental virology and (b) to facilitate harmonisation between laboratories engaged in complementary studies; and (c) to promote educational exchanges. (WG2)

To disseminate the outcomes of the Action, through meetings, symposia, workshops, publications and the Internet. (EG)

Trasferibilità dei risultati

- An updatable Food and Environmental Virology Project Database,
- An algorithm for acquisition, evaluation and interpretation of environmental data,
- A documented structure for an environmental surveillance network,
- Implementation of new skills and knowledge in developing laboratories,

Proliferation vs. differentiation: the pRb pathway in the control of the postmitotic state

Il ruolo della proteina del retinoblastoma (pRb) nel controllo del ciclo cellulare verrà studiato mediante ablazione selettiva di tale proteina in cellule muscolari scheletriche terminalmente differenziate. In tali cellule il ruolo essenziale svolto da pRb nell'induzione dello stato

postmitotico (cessazione definitiva della replicazione) È chiaramente definito, mentre non è chiaro se, una volta che lo stato postmitotico si sia instaurato, pRb sia necessaria per il mantenimento dell'arresto proliferativo. L'utilizzo di cellule muscolari derivate da topi *knockout* condizionali per il gene codificante pRb consentirà di rispondere in maniera univoca al quesito.

Si prevede inoltre lo studio dell'espressione genica modulata da pRb in corso di differenziamento, prevalentemente mediante regolazione epigenetica. A tale scopo saranno impiegati *microarray* di DNA, i quali permetteranno di individuare i geni suscettibili di regolazione da parte di pRb in corso di differenziamento e/o a differenziamento terminale instaurato. Al fine di comprendere i meccanismi mediante i quali pRb esercita il controllo sull'espressione genica saranno studiate le sequenze regolatrici di geni rappresentativi fra quelli individuati mediante analisi con *microarray*.

Risultati attesi nel triennio

I risultati di questo progetto amplieranno le conoscenze di base sui meccanismi che regolano il differenziamento cellulare terminale, cioè quello caratterizzato da un'uscita irreversibile dal ciclo cellulare o stato postmitotico. Sarà definito il ruolo di pRb nel mantenimento dello stato postmitotico, distinto da quello svolto nell'iniziare tale stato. I risultati dello studio dell'espressione genica nel sistema muscolare scheletrico getteranno luce sulla regolazione genica mediata da meccanismi epigenetici durante il differenziamento cellulare.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità di ricerche di base quali quella del presente progetto consiste nella pubblicazione dei risultati su riviste scientifiche e nell'interesse che tali risultati possono avere quali base per successive ricerche.

Proteomic investigation of the mechanisms controlling the cyclin D-dependent kinase

Il progetto prevede l'identificazione mediante spettrometria di massa degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CDKI) che regolano negativamente la funzione delle chinasi cdk4 e cdk6. Al fine di facilitare l'identificazione, le proteine ciclina D1 e cdk4 saranno moderatamente sovraesprese in cellule muscolari scheletriche terminalmente differenziate mediante infezione con adenovirus ricombinanti. I complessi saranno poi immunoprecipitati e le proteine coprecipitate saranno risolte su gel monodimensionali. Le proteine così isolate saranno infine identificate mediante spettrometria di massa. La fase identificativa si avvarrà di strumenti di tipo MALDI-TOF e ESI-MS/MS.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto prevede l'identificazione di specifiche componenti proteiche di complessi macromolecolari che regolano il ciclo cellulare. I risultati rappresenteranno un significativo avanzamento delle conoscenze nel campo del controllo del ciclo cellulare. Segnatamente, approfondiranno la nostra conoscenza dei meccanismi che conservano attivamente l'arresto proliferativo che caratterizza e definisce le cellule terminalmente differenziate.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità di ricerche di base quali quella del presente progetto consiste nella pubblicazione dei risultati su riviste scientifiche e nell'interesse che tali risultati possono avere quali base per successive ricerche.

Questo studio costituisce anche la base necessaria per l'espletamento di un altro progetto del medesimo responsabile scientifico (v. *"The postmitotic state of terminally differentiate cells:*

underlying mechanisms and overriding strategies”), la cui trasferibilità concreta al Servizio Sanitario Nazionale è descritta alla corrispondente voce.

Realizzazione del piano di sorveglianza epidemiologico-sanitaria di una popolazione con esposizione ambientale ad amianto

In un'area della Basilicata caratterizzata da affioramenti di tremolite, successivamente alla segnalazione di alcuni casi di mesotelioma pleurico (Pasetto et al. Annali ISS 2004) sono state avviate le seguenti attività di ricerca.

Studio sulla prevalenza di quadri funzionali respiratori di tipo restrittivo, ostruttivo e misto.

Determinazione delle fibre nell'espettorato indotto.

Studio della prevalenza di placche pleuriche.

Valutazione della presenza di fibre asbestiformi nel parenchima polmonare o in altri reperti anatomo-patologici.

Determinazione dell'esposizione personale a fibre con l'uso di dosimetri individuali.

Studio di sistemi animali sentinella.

Valutazione del livello di rischio delle diverse tipologie di popolazione.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono costituiti da tassi di prevalenza di diversi tipi di patologia respiratoria e di indicatori biologici di esposizione a fibre in fasce di popolazione categorizzate in funzione dei livelli di esposizione a fibre.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio e le procedure in esso messe a punto saranno trasferibili in primo luogo alle altre situazioni italiane caratterizzate da cluster di mesoteliomi causati dalla presenza di fibre asbestiformi nei suoli (Val di Susa, area Etenea), e in secondo luogo ad aree nelle quali si ha presenza di fibre nei suoli in assenza di studi epidemiologici (ad es. versante calabrese del Pollino).

Riconoscimento molecolare e studio metabolico di promotori di crescita di nuova generazione

Identificazione della presenza in mangimi e matrici di origine animale mediante saggi accetoriali e recettoriali di promotori di crescita di nuova generazione. Caratterizzazione della struttura chimica, dell'attività farmacologica e studio del loro metabolismo

Risultati attesi nel triennio

Definizione di saggi di *screening* atti a rilevare la presenza di nuove molecole.

Caratterizzazione chimica di nuove sostanze e loro possibile uso quale *standard* analitici nelle analisi di residui

Trasferibilità dei risultati

Divulgazione e trasferibilità dei risultati ai laboratori del SSN coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti

Riparazione per escissione di basi: connessione col ciclo cellulare e possibile utilizzo per contrastare la trasformazione spontanea

Il progetto (coordinatore Dr. Guido Frosina, IST, Genova) ha due obiettivi principali: 1) la caratterizzazione della riparazione per escissione di basi (*base excision repair*, BER) nel corso delle diverse fasi del ciclo cellulare, con particolare riferimento all'interazione con la replicazione del DNA e, 2) il potenziamento del processo di riparazione BER e l'analisi degli

eventuali effetti sulla trasformazione spontanea. Il nostro laboratorio è coinvolto principalmente nella realizzazione del primo obiettivo. In particolare, verranno analizzati i meccanismi di riparazione BER di lesioni post-replicative utilizzando vettori ricombinanti contenenti singole lesioni e estratti di cellule umane. Si procederà all'analisi della riparazione delle rotture a singolo filamento durante il ciclo cellulare in cellule murine *wild-type* o difettive nel BER. Si studierà la localizzazione di componenti della riparazione per escissione di basi ai foci di replicazione. Infine si caratterizzeranno complessi replicativi isolati da cellule umane per studiare le possibili interazioni tra proteine della replicazione e proteine della riparazione BER.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono: 1) la caratterizzazione della riparazione per escissione di basi nel corso delle diverse fasi del ciclo cellulare e, 2) il potenziamento della riparazione per escissione di basi in cellule di mammifero e eventuali effetti sulla trasformazione cellulare spontanea.

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno condivisi con la comunità scientifica attraverso pubblicazioni scientifiche internazionali. Le informazioni derivate da questo studio forniranno una migliore comprensione del ruolo svolto da difetti nel meccanismo di riparazione BER nell'instabilità genetica e eventualmente nella cancerogenesi.

Rischi emergenti dovuti alla presenza di farmaci ad uso umano e veterinario nelle acque: possibili ricadute sulla salute dell'uomo e degli organismi acquatici

I farmaci ad uso umano e veterinario, indispensabili strumenti per accrescere il benessere e lo sviluppo della società umana, sono considerati, ormai da qualche anno, come contaminanti emergenti dei corpi idrici. I farmaci sono prodotti, venduti e consumati in quantità elevate in tutto il mondo con *trend* in continua ascesa. Per diverse categorie di sostanze (antibiotici, steroidi, stimolatori della crescita animale, disinfettanti, prodotti igienici, antiparassitari, composti citotossici e radioattivi di uso diagnostico) esiste una consolidata conoscenza, a livello internazionale, sulla loro presenza nei corpi idrici superficiali e nelle acque potabili mentre, per sostanze come le droghe d'abuso, i dati di presenza sono ancora scarsi. I farmaci si ritrovano nelle acque in conseguenza di fenomeni di contaminazione puntuale (sversamenti di scarichi civili, industriali e zootecnici, di impianti di acquacoltura e smaltimento non idoneo di rifiuti ospedalieri), dove possono mantenere la loro attività farmacologica e/o produrre metaboliti attivi. I farmaci mostrano attualmente concentrazioni dell'ordine dei ng-mg/litro, come singoli componenti e come miscele, con presenze multiple anche fino a 30 composti in uno stesso campione. Non sono stati tuttora avviati piani di monitoraggio estensivi per la loro ricerca nelle acque, se non in rari casi, anche perché non vi sono riferimenti normativi, almeno a livello europeo, che li includono esplicitamente tra le sostanze su cui indagare (vedere Allegato VIII della Direttiva 2000/60/CE). Nonostante l'esiguità dei dati ecotossicologici, in alcuni studi è stato possibile stabilire che composti come ibuprofen, acido acetilsalicilico, acido mefenamico, aminotriptilina, amoxicillina, destroprossifene, fluoxetina, ossitetraciclina, paracetamolo, propanololo e tioridazina sono presenti nelle acque superficiali a livelli di rischio non trascurabile per gli organismi acquatici, mentre il rischio per l'uomo attraverso l'esposizione tramite l'acqua potabile appare al momento poco rilevante.

Risultati attesi nel triennio

S'intende effettuare un'indagine conoscitiva per ampliare lo stato dell'arte già consolidato in relazione alla presenza dei farmaci in corpi idrici, le loro proprietà chimico-fisiche, chemiodinamiche, tossicologiche e ecotossicologiche e all'acquisizione di tutti quei dati che consentano di definirne la distribuzione nei vari comparti ambientali e nel biota. Inoltre, si intende acquisire dati di produzione e/o di vendita e di presenza il più possibile estesi in modo

da poter costituire, con l'insieme delle informazioni disponibili e in base alle esperienze di ricerca condotte in Italia e in altri paesi, un elenco di farmaci prioritari. Per alcune di queste molecole selezionate si prevede la raccolta, lo studio e l'applicazione di metodi analitici che siano idonei alla ricerca in acque superficiali e sotterranee ma anche di metodi alternativi come i test immunoenzimatici, in particolare per farmaci ad azione ormonale, estrogenica, steroidi e sostanze particolarmente pericolose e persistenti come alcuni farmaci antitumorali. Si prevede la collaborazione con colleghi di Istituto, con gruppi di ricerca italiani e europei, con enti universitari e con Agenzie per il controllo ambientale. La disponibilità di dati di letteratura sulle proprietà ecotossicologiche e tossicologiche e l'acquisizione di dati di dose terapeutica, nonché lo studio delle procedure di valutazione europee e internazionali permetteranno anche di intraprendere attività per la valutazione del rischio di tali composti sulla salute umana e su quella degli organismi acquatici.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di queste attività saranno utilizzati per implementare le conoscenze sui rischi derivanti dalla contaminazione potenziale e effettiva dei corpi idrici e dei sedimenti dovute ai farmaci e per avviare alcune sostanze di particolare interesse alle attività di monitoraggio, proponendole anche a Strutture locali che potrebbero essere interessate da questa tipologia di contaminazione. Si prevedono cicli di seminari e di corsi interni e esterni sull'argomento, già attivati in questi ultimi anni, in collaborazione con le competenze presenti nel nostro Istituto e in Italia. Sono inoltre previste pubblicazioni divulgative di carattere tecnico, come rapporti e linee-guida, e di carattere scientifico con pubblicazioni di livello internazionale.

Rischio genotossico nella filiera alimentare

Studi epidemiologici indicano che una frazione considerevole di tutti i tumori, variabile tra il 20 e il 50 % secondo le stime, è attribuibile a fattori correlati alla dieta. I meccanismi sottostanti questa associazione sono molteplici: la dieta può infatti modulare il rischio individuale di cancro sia alterando la risposta dell'organismo alle sostanze cancerogene, che veicolando tali agenti e contribuendo in modo determinante alla esposizione individuale. Studi tossicologici hanno portato alla identificazione di numerose sostanze genotossiche e cancerogene (idrocarburi policiclici, micotossine, nitrosammine) presenti come contaminanti o *by-products* negli alimenti, e la scoperta continua di nuovi agenti (per esempio l'acrilamide) fa pensare che tale elenco sia tutt'altro che esaustivo. Questa linea di ricerca si propone di contribuire alla identificazione e caratterizzazione dei fattori di rischio genotossico associati all'alimentazione attraverso studi *in vitro* e *in vivo* su contaminanti, *by-products* (furano), micronutrienti (acido folico) e altre sostanze aggiunte intenzionalmente agli alimenti (sostanze aromatizzanti).

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono i seguenti:

- la caratterizzazione della potenziale genotossicità del vanadio somministrato per via orale *in vivo*, una informazione critica per la definizione dei possibili rischi associati alle basse dosi;

- la definizione del potere genotossico del furano *in vivo*, con particolare riferimento ai tessuti bersaglio per gli effetti cancerogeni;

- informazioni sulla genotossicità di classi di composti aromatizzanti, anche ai fini della creazione di modelli di struttura-attività;

- informazioni sull'influenza dell'acido folico sulla stabilità genomica.

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 della popolazione. Tutte le attività proposte hanno potenziale trasferibilità e ricadute sanitarie: la

definizione del rischio genotossico posto dal vanadio è stata riconosciuta in ambito nazionale come un elemento conoscitivo necessario per la fissazione della concentrazione accettabile dell'elemento nelle acque destinate al consumo umano; studi sul potenziale genotossico *in vivo* del furano sono stati indicati come prioritari dall'Unione Europea e dall'EFSA per la valutazione del rischio posto dalla presenza della sostanza come *by-product* negli alimenti; la carenza di informazioni sul potenziale genotossico delle sostanze aromatizzanti, e la conseguente impossibilità di una adeguata valutazione dei rischi per la salute associati al loro impiego, è stata recentemente sottolineata dall'EFSA.

Role of oxidative DNA damage in genome instability and cancer

Saggi *in vitro* per studiare le conseguenze sulla replicazione della presenza di basi ossidate del DNA. Riconoscimento delle basi ossidate da parte dei vari meccanismi di riparazione. Caratterizzazione di un modello murino transgenico con aumentati livelli di espressione di un enzima della riparazione del DNA. Ruolo della proteina hMTH1 nella protezione dal danno ossidativo *in vivo*. Studio dei meccanismi di protezione nelle malattie neurodegenerative.

SIMU6 - Studio su simulatori di guida della performance di soggetti normodati e disabili

Il progetto SIMU6 è il naturale proseguimento di quanto precedentemente svolto dall'ISS nell'ambito del progetto DATIS sull'utilizzo dei simulatori di guida nella valutazione delle caratteristiche di base per una guida sicura, sia in soggetti normodotati sia in soggetti con disabilità di diversa natura.

L'importanza di questo progetto è messa in evidenza da uno dei tanti problemi affrontati, ma certamente quello di maggior rilievo: intendiamo riferirci specificamente all'aumento rapido della popolazione di conducenti anziani, di cui l'ISS ha già prodotto una proiezione per gli anni 2010 e 2020.

Le prove su simulatore di guida presentano, almeno per funzioni basilari per la sicurezza, un livello di sensibilità, specificità, e valori predittivi, di grado superiore a quanto può essere dedotto da esami medici - anche approfonditi - nonché da prove neuropsicologiche.

Peraltro, queste ultime fanno già parte della batteria di test previsti, complementari alle prove su simulatore, in modo da avere una duplice visione di caratteristiche importanti, quali ad esempio la divisione dell'attenzione, sia in termini neuropsicologici, sia in termini più quantitativi e diretti, come possono derivarsi dall'analisi dei dati forniti dalla batteria di prove cognitive presenti su simulatore di guida.

Si osservi a questo proposito come sia presumibile, e già in parte da noi dimostrato nei precedenti progetti, una maggiore sensibilità delle prove su simulatore (dati quantitativi) rispetto ai test neuropsicologici (dati ordinali), nel monitorare nel tempo l'andamento di caratteristiche di questo tipo nello stesso soggetto.

Risultati attesi nel triennio

Allo stato attuale si dispone dei dati relativi a 250 soggetti normodotati (che si presume diventeranno circa 1000 entro l'anno), stratificati per sesso e età e rappresentativi dei conducenti italiani, essendo state le prove effettuate in 16 diverse province del nord, centro e sud-isole della penisola, grazie alla collaborazione dei Centri di Mobilità Fiat-Auto (CMFA) presenti in tutto il territorio nazionale.

Per quanto riguarda i disabili, i CMFA hanno messo a disposizione dell'ISS i risultati delle prove di circa 3000 soggetti, prove che acquisteranno un carattere informativo di notevole valenza grazie alla linea di base dei soggetti normodotati (i risultati di questa analisi saranno di

grande utilità nella rivalutazione e controllo di molti limiti di normativa precedentemente stabiliti).

Si osservi che questo tipo di operazione ha anche un preciso interesse normativo, anche alla luce dell'esistenza di un'apposita commissione istituita recentemente dal Ministro della Salute (nella quale è presente un rappresentante dell'ISS), che collaborerà strettamente con analoga commissione del Ministero delle Infrastrutture e dei Trasporti.

Quindi, in sintesi, oltre ad aversi una linea di base per le funzioni minimali irrinunciabili per una guida sicura, si avrà - grazie al copioso materiale informativo sui disabili - la possibilità di definire limiti operativi più congruenti con la sicurezza anche per soggetti che presentano problemi legati a traumi o malattie diverse.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto SIMU6 hanno una loro naturale trasferibilità sul versante delle problematiche legislative legate ai problemi di idoneità alla guida, come pure possono rappresentare informazione di base trasferibile alle commissioni medico locali cui spetta il compito di definire se un soggetto sia idoneo o meno alla conduzione di un veicolo.

Sistema Informativo Nazionale sugli Infortuni in Ambienti di Civile Abitazione - SINIACA

Il sistema SINIACA è un sistema di monitoraggio permanente degli incidenti in casa istituito presso l'ISS dalla Legge 493/99 (art.4). L'analisi degli incidenti e delle loro conseguenze viene condotta a tre livelli progressivi di gravità degli eventi stessi: accessi al pronto soccorso, ricoveri, decessi. Al sistema, infatti, confluiscono i dati ISTAT di mortalità nell'anno, le schede di dimissione ospedaliera (SDO) e i dati sugli accessi al pronto soccorso per incidenti in casa di circa 80 centri di pronto soccorso di tutte le regioni italiane. Ai fini dell'attivazione del sistema l'ISS ha predisposto per le regioni un'apposita modulistica e ha realizzato un sistema informativo nel quale confluiscono con periodicità trimestrale i dati di pronto soccorso e semestralmente quelli delle SDO, secondo un comune tracciato record, anch'esso predisposto dall'ISS.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto ha fornito ad oggi numerosi prodotti, in parte già utilizzati dalle regioni, in particolare per la formulazione delle azioni relative alla sicurezza in casa dei Piani Sanitari Regionali. È stata anche preparata un'apposita relazione generale, recentemente trasmessa agli organi competenti, relazione ove compare il quadro complessivo del fenomeno come pure un insieme di indicazioni per la prevenzione.

Di particolare rilievo, a quest'ultimo proposito, è il fatto che dette indicazioni sono state basate sull'analisi delle descrizioni "aperte" degli incidenti in casa, ove le dinamiche di accadimento degli eventi sono descritte in maniera molto particolareggiata, cosa non possibile in termini di risposte "chiuse". In questo modo, oltre a distinguere eventi accidentali in senso stretto da eventi accidentali derivanti da problemi contingenti di salute (es. cadute in seguito a malore) si ha anche una precisa indicazione su strutture, impianti e prodotti coinvolti nell'incidente.

Alla luce dei risultati ad oggi ottenuti si stanno gettando le basi per la realizzazione di un sistema integrato, comprensivo di un modulo di "allerta rapida", specificamente utile per l'identificazione dell'immissione sul mercato di prodotti non sicuri.

Trasferibilità dei risultati

L'impostazione del sistema SINIACA è stata pensata anche in funzione di quanto già esisteva sia a livello locale, sia soprattutto a livello europeo. In particolare, l'integrazione

SINIACA-EHLASS (Sistema di sorveglianza europeo) sta creando interessanti sinergismi con l'UE, nonché nuove possibilità di confronto con i dati dei diversi Paesi.

Sistema ULISSE (Sistema nazionale di monitoraggio dell'uso del casco e delle cinture di sicurezza)

Il Sistema Ulisse, previsto dal Piano Nazionale della Sicurezza Stradale (PNSS), è stato realizzato, in fase sperimentale, nell'ambito del Progetto DATIS, finanziato dal Ministero delle Infrastrutture e dei Trasporti. Attualmente, si è entrati in una fase di regime in quanto al Sistema ogni mese pervengono osservazioni svolte su strada in tutte le regioni relative all'uso del casco e delle cinture di sicurezza. I dati opportunamente valutati a livello statistico, sia nel mese studiato, sia in rapporto all'intera serie storica, sono messi, poi, a disposizione del comitato di gestione del PNSS, di cui l'ISS fa parte tramite un suo rappresentante. Il PNSS trasmette, poi, detti risultati a tutte le amministrazioni competenti.

Risultati attesi nel triennio

Il Sistema Ulisse fornisce oggi in tempo reale importanti indicazioni per mantenere alti i livelli d'uso dei dispositivi di sicurezza, in quanto sia in termini relativi al territorio (zona urbana centrale, zona urbana periferica, zona extraurbana, autostrada), sia in termini d'uso nel tempo, traccia un quadro completo dei livelli di utilizzazione di casco e cintura, il cui uso, come è noto, dimezza, in caso di incidente, la probabilità di morte e il quadro di gravità delle lesioni.

Trasferibilità dei risultati

Il Sistema Ulisse ha posto il nostro Paese a livello dei Paesi più avanzati dell'Unione Europea (UE), colmando una lacuna importante. I dati prodotti dal Sistema, peraltro, permettono confronti diretti con quelli rilevati in altri Paesi e danno, quindi, un'indicazione importante, anche di tipo comparativo, dei livelli raggiunti dall'Italia in questo settore a fronte degli obiettivi di sicurezza stradale fatti propri dagli stati dell'UE.

Sistemi di informazione e meccanismi di valutazione, gestione e riduzione del rischio legato all'uso di sostanze e preparati pericolosi

Nel triennio 2006-2008 si intendono sviluppare ulteriormente tutta una serie di attività nel campo delle sostanze e dei preparati chimici potenzialmente pericolosi per l'uomo e per l'ambiente.

Nel settore delle sostanze chimiche si intende continuare a partecipare al dibattito scientifico internazionale per lo sviluppo del nuovo sistema REACH (Registrazione, Valutazione e Autorizzazione delle sostanze chimiche), attualmente ancora in fase di definizione come regolamento comunitario. Una delle differenze sostanziali con il sistema attuale è l'eliminazione delle differenze di approccio fra le sostanze chimiche nuove e le sostanze esistenti: l'Unità di Notifica verrà quindi profondamente ristrutturata per far fronte al nuovo approccio. Si intende anche partecipare attivamente alla definizione delle Linee Guida Internazionali per l'attuazione pratica delle varie fasi attuative del REACH.

Per quanto riguarda i sistemi di classificazione delle sostanze e dei preparati pericolosi, si intende continuare a collaborare attivamente all'ulteriore sviluppo del sistema GHS (*Globally Harmonize System*), che unifica i sistemi di classificazione adottati dai Paesi più industrializzati. In particolare si intende partecipare alla definizione di nuovi criteri per specifici *end points* nonché alla valutazione delle conseguenze applicative della nuova classificazione nei confronti di tutti i settori normativi legati ai sistemi di classificazione.

Si intende anche proseguire l'attività tecnico-scientifica per l'applicazione della direttiva comunitaria sui prodotti biocidi (direttiva 98/8/CE), soprattutto per quanto riguarda la revisione dei principi attivi che la Commissione europea ha affidato all'Italia come Paese Relatore.

Si intende anche sviluppare l'attività di aggiornamento e revisione delle Banche dati sulle sostanze chimiche prodotte dall'Istituto e accessibili attraverso la pagina web dell'ISS (Banca Dati Cancerogeni, Banca Dati classificazione di pericolo, Archivio Preparati Pericolosi); in particolare per l'Archivio Preparati Pericolosi, che contiene informazioni sulla composizione chimica dei preparati pericolosi presenti sul territorio nazionale, è previsto l'ampliamento al settore dei detergenti, come previsto dal regolamento comunitario n. 648/2004/CE.

Si prevede infine lo sviluppo di nuove attività sperimentali per la messa a punto e applicazione a indagini nazionali di metodiche analitiche per la determinazione di componenti pericolosi in preparati di uso domestico e per la valutazione di problematiche di particolare interesse sanitario o ambientale.

Risultati attesi nel triennio

Definizione di nuovi criteri di valutazione e classificazione per *end points* tossicologici e ecotossicologici, quali:

- neurotossicità;
- irritazione respiratoria;
- tossicità attivata dall'acqua;
- effetti narcotici.

Definizione dei criteri per l'individuazione delle sostanze PBT (persistenti, bioaccumulabili e tossiche) e vPvB molto persistenti e molto bioaccumulabili) nell'ambito delle procedure di autorizzazione previste dal REACH

Inserimento nell'Allegato I della direttiva 98/8/CE delle sostanze attive affidate all'Italia, a seguito del dibattito scientifico che avrà luogo nelle Riunioni Tecniche con gli altri Paesi UE

Messa a punto e applicazione di metodiche analitiche per l'identificazione di sostanze pericolose in diverse matrici.

Sostanze attive antiparassitarie e prodotti fitosanitari: studio delle problematiche connesse alla messa in commercio e uso degli antiparassitari

Il controllo dei requisiti di qualità e la valutazione delle implicazioni tossicologiche e sanitarie dei principi attivi antiparassitari e dei prodotti fitosanitari immessi in commercio è regolamentata dal DL.vo n.194 del 17.3.95, che recepisce la direttiva 91/414/CEE, che definisce le modalità per la valutazione delle proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche delle sostanze attive e dei prodotti fitosanitari ai fini della loro registrazione sul territorio nazionale.

Le sostanze antiparassitarie e i prodotti fitosanitari devono rispettare particolari specifiche chimico fisiche e di composizione dettate da organismi sovranazionali (FAO, WHO, CIPAC) e dalla legislazione nazionale e comunitaria, che tendono a definire la qualità del materiale usato nel preparare le formulazioni e le condizioni di immagazzinamento. Anche la presenza di impurezze tossicologicamente attive è soggetta a normative che ne indicano la concentrazione massima tollerabile. Tali impurezze possono essere sostanze con significato tossicologico e pericolosità di gran lunga maggiore della sostanza madre. Si rende necessaria un'attività di ricerca per lo sviluppo di metodologie analitiche per l'individuazione di eventuali deviazioni dalle specifiche nazionali e internazionali dei prodotti fitosanitari, al fine di un pronto intervento in sede legislativa, ove gli studi condotti evidenzino fattori di rischio e pericolo per i lavoratori esposti o per la popolazione in genere.

Risultati attesi nel triennio

Raccolta di informazioni sulle impurezze di interesse tossicologico in principi attivi tecnici e in prodotti fitosanitari da sottoporre ad indagine.

Sviluppo e convalida di metodi analitici per l'individuazione e il dosaggio di impurezze e coformulanti in preparati commerciali, in assenza di metodi ufficiali o ritenuti validi a livello internazionale.

Caratterizzazione delle impurezze e dei relativi livelli di concentrazione presenti in classi significative di preparati commerciali.

Organizzazione di saggi interlaboratorio per il controllo di qualità tra laboratori selezionati del Servizio Sanitario Nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Raccolta ed elaborazione dei dati ottenuti ai fini dell'individuazione dei rischi sanitari e ambientali derivanti dall'uso di preparati a base di principi attivi tecnici non corrispondenti ai requisiti di qualità individuati e della possibilità di inquinamento delle derrate e degli alimenti da parte di impurezze di interesse tossicologico, in seguito a trattamenti con prodotti fitosanitari.

Sulla base di quanto riportato dall'art. 17 del DL.vo n.194 del 17.3.95 e di quanto richiesto dal Ministero della Salute all'Istituto, individuare e supportare, di concerto con Regioni e Province Autonome, i laboratori P.M.I.P./A.R.P.A. che siano in grado di effettuare analisi di corrispondenza ai requisiti di qualità dichiarati dal produttore o ritenuti validi da organismi internazionali (UE, FAO) per i principi attivi tecnici e per i prodotti fitosanitari, relativamente al contenuto in principio attivo e alle impurezze eventualmente presenti.

Stabilità biologica di prodotti derivanti dai processi di compostaggio valutata mediante il valore dell'indice di respirazione

Il progetto è finalizzato allo studio della stabilità di un prodotto compostato, intesa come il livello di attività biologica in un cumulo di compostaggio. Rappresenta una misura diretta dell'efficienza del processo adottato, dell'impatto ambientale in termini di odori, insufficiente igienizzazione, potenziale ricolonizzazione da parte di microrganismi patogeni e determina l'idoneità o meno del compost per i differenti utilizzi. Un compost non stabilizzato, infatti, consuma azoto e ossigeno in quantità significative per supportare l'attività biologica e pertanto continua a richiedere azoto anche quando applicato ad un suolo, causando danni alla crescita delle piante; inoltre, se stoccato e aerato in maniera non adeguata, può passare a condizioni anaerobiche, provocando problemi di odori.

Per la valutazione della stabilità di un compost sono stati proposti numerosi metodi analitici basati su diversi principi sia chimici che fisici che biologici, ma il mezzo più idoneo è ritenuto essere la determinazione dell'attività respiratoria.

La ricerca proposta riguarda lo studio e la messa a confronto di diverse metodologie di analisi in compost sia di qualità che non di qualità.

I metodi saggiati sono: test respirometrici riportati in letteratura e/o di facile esecuzione con valutazione della carica microbica globale; valutazione del rapporto BOD/COD.

Risultati attesi nel triennio

Negli ultimi anni il processo di compostaggio sta ottenendo numerosi consensi per ragioni di tipo economico, in quanto tecnologia dai costi contenuti; ambientale, in quanto il prodotto risulta essere un ottimo ammendante con scarse proprietà inquinanti e sociale perché può considerarsi un'alternativa allo smaltimento di alcune tipologie di rifiuto.

Tale processo è caratterizzato da una fase di intensa degradazione delle molecole organiche sino al raggiungimento della stabilità biologica e da una successiva fase di umificazione; l'intero processo rappresenta l'evoluzione della sostanza organica.

Poiché i concetti di stabilità biologica, maturità e grado di evoluzione di un compost o di un rifiuto organico sottoposto a trattamento biologico, sono oggetto di numerose interpretazioni, è opportuno darne la definizione più rappresentativa del processo stesso. Nonché stabilire di conseguenza le metodologie analitiche più idonee e di più facile esecuzione.

Da quanto sopra esposto, tenendo conto anche di un'indagine letteraria, si può concludere che per tale scopo le migliori tecnologie applicabili risultano essere quelle per valutare l'attività respiratoria.

Trasferibilità dei risultati

Da un punto di vista legislativo per la stabilità biologica, le normative sono ancora in fase di studio sia in ambito nazionale che europeo. I risultati di tale studio possono essere utilizzati per un supporto alle decisioni normative.

Studio dei meccanismi di migrazione da materiali a contatto con alimenti

La ricerca è dedicata allo studio della cinetica di trasferimento di sostanze chimiche contenute in taluni materiali a contatto con alimenti sia diretto (capsule, film, ecc.) che indiretto (trasferimenti in *head space*, materiali a contatto con alimenti solidi e secchi).

Risultati attesi nel triennio

L'approfondimento sperimentale permetterà di fornire un contributo al perfezionamento dei modelli predittivi sviluppati per calcolare l'entità della migrazione dai materiali agli alimenti.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche

Studio dell'applicabilità dell'analisi dei rischi e dell'HACCP come sistemi di valutazione e gestione del rischio specifici per la conformità di imballaggi per alimenti

Lo studio prevede l'applicazione comparativa di sistemi HACCP e *Risk Analysis* alla produzione di materiali in contatto con alimenti.

Risultati attesi nel triennio

Verranno sviluppati strumenti applicativi per categorie specifiche di imballaggi (es. materiali di riciclo).

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni e linee guida applicative per gli operatori del settore.

Studio dell'esposizione della popolazione di Taranto, Statte, Crispiano e Massafra ad inquinanti presenti nell'aria ambiente. Convenzione ISPESL-ISS

Lo studio ha l'obiettivo di accertare lo stato di contaminazione ambientale dell'area in studio e di effettuare la valutazione dell'esposizione umana delle popolazioni residenti ad inquinamento atmosferico, attraverso l'analisi del comportamento umano. Data l'ampia variabilità del fenomeno espositivo, la metodologia di indagine per la raccolta di informazioni sulle abitudini e stili di vita della popolazione (*time budget*) e la tecnica di valutazione delle informazioni raccolte (tecniche probabilistiche di analisi) sono in linea con quelle adottate in analoghi studi internazionali (*National Human Assessment Survey* (NEXHAS), JEAE, vol 9, n.5, 1999)

Risultati attesi nel triennio

I risultati dello studio sulle abitudini e stili di vita della popolazione, per sesso e età, consentono di effettuare: la stima dei tempi trascorsi in ambienti chiusi e aperti; la stima dei ratei

di ventilazione inalatoria associati alle differenti attività individuali e dei ratei medi giornalieri; la stima quantitativa dell'esposizione inalatoria in relazione ai differenti inquinanti presenti; l'identificazione dei gruppi di popolazione a maggior rischio sia per area sia per abitudini

Trasferibilità dei risultati

I risultati offrono indicazioni per la identificazione di idonee misure di riduzione del rischio nella popolazione locale. Inoltre, la ricerca fornisce un contributo metodologico allo sviluppo di metodi per la valutazione dei rischi per la salute associati all'esposizione ad inquinamento ambientale

Studio epidemiologico di popolazioni esposte a campo magnetico a 50 Hz

Lo studio, iniziato nella primavera del 2004 e coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con alcuni Dipartimenti clinici dell'Università degli Studi "La Sapienza", con il Dipartimento di Epidemiologia della ASL RM E e con l'Agenzia di Sanità Pubblica della Regione Lazio, è stato condotto a Longarina per la presenza di abitazioni a ridosso di un elettrodotto, e prende in esame l'area a 100 metri a destra e a sinistra dalla linea. L'elettrodotto, già presente quando sono stati costruiti i primi edifici alla metà degli anni '50, determina, soprattutto nella fascia di abitazioni più vicine, livelli di campi magnetici più elevati (indicativamente, da 0.4 a 4 microtesla), rispetto a quelli che si riscontrano abitualmente nei centri urbani (circa 0.1 microtesla). Lo studio si suddivide nelle seguenti quattro linee di ricerca : a) mortalità e ricoveri ospedalieri delle persone residenti a Longarina a partire dalla nascita del quartiere; b) valutazione dello stato di salute di un gruppo di 250 persone attualmente residenti; c) studio sugli animali da compagnia (cani e gatti). d) valutazione dell'esposizione a campi magnetici.

Risultati attesi nel triennio

La mortalità generale, per tutte le cause insieme,, non è risultata diversa da quella media della popolazione della regione Lazio. Nelle persone che hanno abitato nell'area per i tempi più prolungati, oltre 30 anni, sono stati registrati, nel periodo considerato, 8 decessi per tumore, che, se confrontati con i dati della popolazione regionale, fanno emergere un raddoppio di mortalità per questa causa. La mortalità per tumori è più elevata nella zona più vicina alla linea elettrica. Di tutte le persone che hanno risieduto a Longarina dal 1954 in poi, e per i quali è stato già effettuato lo studio di mortalità, si analizzeranno tutti i ricoveri in ospedale registrati dalla Regione Lazio nel periodo 1998-2003. Lo studio sullo stato di salute delle circa 250 persone oggi residenti nell'area in esame è in corso. Vengono effettuati esami clinici, ematologici, cardiologici (determinazione della variabilità del ritmo cardiaco e variazioni della pressione arteriosa nelle 24 ore) e misura della 6-sulfossimetatonina urinaria. Circa l'80% delle persone di Longarina hanno già effettuato gli esami. Si è proceduto inoltre ad un censimento e una identificazione preliminare degli animali da compagnia (cani e gatti). In occasione della prima visita medica è stato compilato un questionario relativo alla storia e alle abitudini di vita dell'animale e è stato identificato laddove possibile il veterinario curante. Gli animali inclusi nello studio saranno nei prossimi mesi oggetto di prelievi e analisi da concordare insieme ai proprietari. Contemporaneamente, si sta lavorando a rendere ancora più preciso il modello che rappresenta la diffusione del campo magnetico nel quartiere intorno alla linea.

Trasferibilità dei risultati

Questo progetto porterà a un migliramento delle conoscenze da utilizzare nella valutazione di impatto sanitario degli elettrodotti. In Italia, con riferimento alla sola rete dell'alta tensione, si stima che circa 37.000 persone siano esposte a più di 1 microtesla come valore medio nel tempo; e per consolidare le conoscenze prodotte da questo studio, sarà sicuramente necessario prendere in esame altri campioni di popolazione.

Studio sull'eventuale presenza di sostanze tossiche in un compost maturo mediante test di ecotossicità

I trattamenti biologici quali i processi di compostaggio, di biostabilizzazione e di bioessiccamento vengono molto spesso utilizzati nel trattamento dei rifiuti urbani, per ottenere prodotti che possono essere in seguito utilizzati in campo agricolo, per la ricopertura giornaliera di discariche etc.

I prodotti di tali trattamenti, a seconda del loro utilizzo, necessitano di numerosi controlli al fine di valutarne l'idoneità, nonché la qualità.

A tale scopo è molto importante la valutazione della stabilità biologica di un compost, che legata al rallentamento dell'attività degradativa della sostanza organica, da parte dei microrganismi, è sinonimo del concetto di maturità, cioè l'assenza di effetti fitotossici sui vegetali. In un prodotto stabile e maturo sono presenti infatti quantità elevate di sostanze umiche e non più sostanze ecotossiche eventualmente formatesi nelle prime fasi del processo stesso di trattamento.

La ricerca che viene proposta riguarderà uno studio che, ai noti test di vegetazione che prevedono saggi di germinazione e di accrescimento, verranno affiancati due metodi che utilizzano direttamente la matrice solida, anziché il suo estratto acquoso. Tali metodi prevedono l'utilizzo di un test di tossicità basato sulla capacità di sopravvivenza e di crescita di un organismo bentonico appartenente alla famiglia degli Ostracodi e di un test di fitotossicità che utilizza i semi di tre specie diverse di piante a rapida crescita.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi di tale studio lavoro sono due: da una parte verificare l'idoneità dei metodi ecotossicologici sulla matrice compost e dall'altra valutare la presenza di sostanze tossiche eventualmente prodotte durante il processo di maturazione, difficilmente individuabili altrimenti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti, opportunamente trattati possono essere utilizzati mediante modellizzazione, per sviluppare un'analisi del rischio ecologico

Sviluppo di un metodo per la valutazione della presenza di sostanze ad attività ormonale di derivazione esogena attraverso lo studio dei profili ormonali naturali negli allevamenti zootecnici

Messa a punto e dosaggio di neurosteroidi in matrici di origine animale quali bio-indicatori di esposizione a sostanze che possono interferire con la fisiologia degli ormoni naturali nella specie bovina

Risultati attesi nel triennio

Determinazione dei livelli basali di neurosteroidi nella specie bovina.

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità dei risultati ai laboratori del SSN impegnati nella valutazione del benessere e nell'analisi

Sviluppo di una procedura standardizzata per la messa a punto e la convalida intralaboratorio di metodi analitici dedicati alle cessioni dai materiali in contatto con gli alimenti

Il Reparto è sede del Laboratorio Nazionale di Riferimento per i materiali in contatto con alimenti. Nel 2006 la struttura deve diventare operativa. Pertanto, il piano prevede lo sviluppo di

una procedura di convalida comune applicabile ai metodi analitici per test di migrazione specifica.

Risultati attesi nel triennio

Verrà prodotta una linea guida operativa, utile sia all'interno del Reparto, sia per la diffusione fra i laboratori dell'SSN.

Trasferibilità dei risultati

Laboratori SSN

Sviluppo e validazione di metodi multiresiduo per l'analisi di antiparassitari in alimenti di origine animale e organizzazione di circuiti interlaboratorio

L'impiego di antiparassitari utilizzati come farmaci veterinari e per la protezione di derrate alimentari porta alla comparsa di residui i cui Livelli Massimi di Residuo (LMR) sono stabiliti al momento della registrazione per l'impiego o durante rivalutazione tossicologica (D.M. 27.8.2004 e Reg. CE 2377/90). Il Ministero della Salute da tempo stabilisce dei Piani di Monitoraggio Nazionale per valutare la conformità ai LMR fissati.

Il progetto ha lo scopo di sostenere l'attività della sezione Antiparassitari del Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per i residui negli animali vivi e nei loro prodotti che ha sede presso l'Istituto Superiore di Sanità (Decisione della Commissione 98/536/CE). Al Reparto Antiparassitari sono affidate le analisi delle sostanze dei gruppi B2(c)-carbammati e piretroidi, B3(a)-composti organoclorurati e B3(b)-composti organofosforati dell'allegato 1 del DL.vo 4.8.99 n. 336. Tra i compiti del LNR è prevista la messa a punto di metodi per il controllo ufficiale dei campioni. I metodi devono essere validati in conformità alla Decisione della Commissione 2002/657/CE e alla 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 sono tenuti a partecipare per mantenere il proprio sistema in Qualità e l'elaborazione e valutazione dei dati prodotti.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio 2006-2008, si prevede lo sviluppo di metodi multiresiduo da usare per 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 la ricerca di altri pesticidi di difficile indagine su matrici complesse quali i prodotti di origine animale. I metodi del Reparto utilizzano processi su matrice solida per soddisfare i requisiti di rapidità, facilità di esecuzione, miniaturizzazione delle procedure di analisi in favore di bassi consumi di solventi e materiali e 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 e normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025). Al fine di procedere con una completa validazione, le metodiche dovranno essere applicate su quattro matrici rappresentative (documento SANCO/825/00).

Inoltre, verranno organizzati dei gruppi di lavoro tra gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e il Laboratorio Nazionale di Riferimento per i residui negli animali vivi e nei loro prodotti dove trattare problematiche di settore e partecipare a circuiti interlaboratorio.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto è mirato a sostenere le attività del Laboratorio Nazionale di Riferimento per i residui negli animali vivi e nei loro prodotti (art. 20, DL.vo 4 agosto 1999, n. 336).

La messa a punto di metodi validati servirà anche a sostenere gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali nelle loro attività di monitoraggio. I dati dei Piani Nazionali di Monitoraggio vengono raccolti dal Ministero della Salute e trasmessi annualmente alla Unione Europea, che li utilizza per la valutazione del rischio per la popolazione.

Sviluppo e validazione di metodi multiresiduo per l'analisi di residui di antiparassitari negli olii di oliva

Lo sviluppo di metodi multiresiduo validati per l'analisi di residui di antiparassitari negli alimenti è indispensabile per poter valutare il rispetto del Decreto del 27 agosto 2004: "Prodotti fitosanitari: limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione" e dei successivi aggiornamenti, che regolamentano in Italia la presenza dei residui di antiparassitari negli alimenti. Dal 1997 il Reparto Antiparassitari coordina un Gruppo di Lavoro sui residui di antiparassitari negli olii di oliva all'interno della sezione dei Chimici del Consiglio Oleicolo Internazionale (COI). Il COI è una organizzazione intergovernativa sotto il patrocinio delle Nazioni Unite che promuove diverse attività in tutti i settori che riguardano il mondo delle olive e dell'olio di oliva. La sottoscritta ha partecipato nel tempo all'organizzazione di 5 *Proficiency Tests* per il COI su antiparassitari nell'olio di oliva coinvolgendo diversi laboratori dell'area mediterranea. Al momento la sottoscritta è incaricata del coordinamento per il proseguimento dei lavori del Gruppo sopracitato e propone che sia approvato un piano triennale per lo sviluppo di metodi multiresiduo validati per le differenti classi di antiparassitari negli olii di oliva: organofosforati, organoclorurati, piretroidi, carbammati e benzoilureici. Lo sviluppo di tali metodi si ritiene utile al fine di organizzare dei *Proficiency Tests* sull'olio di oliva diretti ai laboratori del Servizio Sanitario Nazionale, APPA e ARPA allo scopo di armonizzare le metodiche utilizzate dai laboratori preposti al controllo degli alimenti.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di metodi di analisi validati per differenti classi di residui di antiparassitari negli olii di oliva. Tali metodi richiedono un'ampia ricerca per lo sviluppo di tecniche di estrazione, purificazione e analisi strumentale aggiornati alle odierne conoscenze tecniche scientifiche.

Realizzazione di *Proficiency Tests* sui residui di antiparassitari negli olii di oliva in collaborazione con i laboratori del Servizio Sanitario Nazionale e altri Enti Nazionali e Internazionali.

Trasferibilità dei risultati

Applicazione dei metodi di analisi per gli antiparassitari sviluppati negli olii di oliva, ad altre matrici grasse di origine vegetale

Sviluppo e validazione di metodologie analitiche per la ricerca di residui di antiparassitari in prodotti ortofrutticoli

Il progetto ha lo scopo di ottimizzare le procedure di validazione di metodologie analitiche al fine di ottenere metodi di riferimento da impiegare in tutti i laboratori delle ARPA, APPA, USL preposti ai controlli ufficiali dei prodotti alimentari, anche alla luce dei piani triennali (anni 2003-2005) di sorveglianza sanitaria e ambientale sugli effetti dovuti all'uso di prodotti fitosanitari (art. 17 del DL.vo n. 194/95), volti tra l'altro allo sviluppo di metodologie analitiche idonee al controllo di matrici vegetali e animali per la presenza di residui di principi attivi di

antiparassitari a livello di 0,01 mg/kg e alla valutazione dell'esposizione dei consumatori ai residui di pesticidi tramite la dieta. Tali metodi, sviluppati in ISS in collaborazione con colleghi dei laboratori delle strutture pubbliche sopra citate e validi per una o più classi di principi attivi, potrebbero essere estesi mediante l'effettuazione di un numero limitato di prove aggiuntive ad altre matrici rispetto a quelle per cui sono stati sviluppati, cosa auspicata come di notevole valore dai rappresentanti delle Regioni e delle Province Autonome di Trento e Bolzano presenti alla riunione tenutasi ultimamente in Istituto in data 27 ottobre 2005 nell'ambito dei "Piani triennali di sorveglianza sanitaria e ambientale su eventuali effetti derivanti dall'utilizzazione dei prodotti fitosanitari".

Risultati attesi nel triennio

Costituzione di un gruppo di lavoro ISS-ARPA-APPA per la discussione di problematiche tecniche relative alle metodologie analitiche per l'analisi di residui di prodotti fitosanitari in matrici alimentari.

Sviluppo e validazione di dette metodiche analitiche multiresiduali.

Sviluppo e validazione di metodiche analitiche per singoli composti che non possano essere fatte rientrare in metodi multiresiduo.

Edizione di un manuale di raccolta dei metodi multiresiduo e per singoli composti sviluppati nell'ambito del progetto.

Trasferibilità dei risultati

Il risultati ottenuti potrebbero essere impiegati per estendere l'applicabilità dei metodi sviluppati ad altri composti e/o altre matrici nell'ambito delle analisi di matrici alimentari.

Sviluppo, validazione e applicazione di metodologie multiresiduo per la determinazione di residui di antiparassitari in alimenti destinati all'infanzia

La Commissione Scientifica per gli alimenti nell'ambito della Comunità Europea, al fine di tutelare adeguatamente la salute dei bambini, ha regolamentato l'immissione in commercio degli alimenti destinati all'infanzia con le Direttive Comunitarie 91/321 del 14/05/1991 e 96/5 del 16/02/1996 rispettivamente recepite in Italia con DM 6 aprile 1994, n. 500 e DPR 7 aprile 1999, n. 128. In tali normative sono definiti i Limiti Massimi dei Residui (LMR) specifici per gli alimenti destinati all'infanzia, e è stato fissato il valore generico di 0.01 mg/kg per ogni singolo antiparassitario, fatta eccezione per alcuni principi attivi indicati nella normativa, per i quali è stato fissato un valore più basso.

Il progetto ha lo scopo di sviluppare e validare metodiche analitiche multiresiduo necessarie per il controllo dei livelli di residui di antiparassitari negli alimenti e nelle bevande destinati all'infanzia.

Al fine di soddisfare i LMR fissati per gli alimenti dell'infanzia che sono più bassi dei corrispondenti LMR fissati per gli alimenti destinati alla popolazione in generale, le metodiche analitiche devono raggiungere livelli di sensibilità e selettività adeguati.

I metodi sviluppati devono poi essere sottoposti ad un processo di validazione in accordo alla normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025, che impone specifici criteri di qualità dei dati analitici prodotti.

Con questo progetto si intende proseguire l'attività già intrapresa nell'ambito dei Piani Triennali (2003-2006) per il controllo e la valutazione degli effetti derivanti dall'uso di prodotti fitosanitari, definito dall'Art. 17 del DL.vo n. 194 del 17 marzo 1995.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio 2006-2008 si ritiene possibile lo sviluppo di più metodi analitici riferiti alle classi di composti principalmente usati o particolarmente importanti per le loro caratteristiche tossicologiche o di ricaduta sanitaria, cercando di proporre metodi multiresiduo. Saranno inoltre

individuare le matrici alimentari rappresentative in funzione delle loro proprietà chimico fisiche: a base grassa (alimenti di origine animale), quelle con scarso contenuto di grassi (alimenti di origine vegetale), quelle acide o neutre e quindi saranno sviluppati metodi per ciascuna matrice.

I metodi sviluppati verranno avviati alle procedure di validazione che per la loro complessità richiedono tempi molto ampi.

Verranno condotti controlli dei livelli di residui di antiparassitari nei prodotti destinati all'infanzia disponibili sul mercato, dividendo i prodotti per fascia di età del consumatore. Verranno considerati principalmente considerati gli alimenti usati nel periodo dell'allattamento e nel periodo dello svezzamento.

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: Aziende Sanitarie Locali (ASL), Agenzie Regionali per La Protezione dell'Ambiente (ARPA) e Istituti Zooprofilattici Sperimentali Regionali (IZS). I dati ottenuti dai monitoraggi sono trasferibili al Ministero della Salute.

The postmitotic state of terminally differentiated cells: underlying mechanisms and overriding strategies

Nell'ambito di un altro progetto facente capo al medesimo responsabile scientifico, saranno individuati gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti che svolgono un ruolo chiave nel mantenere lo stato postmitotico in cellule terminalmente differenziate o nel limitare la proliferazione di cellule pur dotate di capacità replicativa. L'identificazione degli inibitori-chiave nei sistemi cellulari considerati sarà seguita da uno studio funzionale mediante sistematica soppressione di tali inibitori con metodi di interferenza a RNA (RNAi). Saranno valutate le conseguenze dell'interferenza con detti inibitori in termini di induzione della proliferazione in cellule quiescenti, senescenti e terminalmente differenziate. I risultati ottenuti saranno eventualmente applicati alla promozione della proliferazione di cellule staminali e altri tipi cellulari dotati di potenziale replicativo ma di limitata proliferazione in coltura e/o *in vivo*.

Risultati attesi nel triennio

Si prevede l'ampliamento delle conoscenze di base sui meccanismi di regolazione del ciclo cellulare in cellule terminalmente differenziate e non. Sarà chiarificato il ruolo degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CDKI) nel controllo del ciclo cellulare, con particolare riguardo all'importanza di specifici inibitori in particolari tessuti, essendo ben nota la tessuto-specificità dell'espressione delle CDKI.

Trasferibilità dei risultati

In caso di successo i risultati ottenuti potranno tradursi in protocolli di pratica utilizzabilità per la manipolazione *in vitro* di cellule staminali e di altri tipi cellulari di interesse bioingegneristico caratterizzati da limitata proliferazione in coltura. È concepibile la brevettabilità di parte dei risultati e il loro susseguente sfruttamento economico.

UO ISS2 nel EU Strep project *In vitro* assessment of biocompatibility: a tissue-oriented, hierarchically organized approach.(BioCompass)

Prima del loro utilizzo in clinica gli AVS debbono ottenere la certificazione di marchio CE, che tra gli altri parametri comporta anche la valutazione relativa alla biocompatibilità. In alcuni caso però, è stato necessario ritirarli dal mercato e dall'uso clinico in seguito alla comparsa di gravi effetti collaterali che non erano stati previsti sulla base dei dati disponibili ottenuti attraverso gli studi attualmente richiesti a scopo regolatorio. Questo evidenzia l'inadeguatezza

delle attuali procedure e quindi la necessità di un loro miglioramento. In questa ottica il Progetto si propone come principali obiettivi: 1) la definizione di una strategia *in vitro* per la valutazione di sicurezza degli AVS (*artificial vitreous substitutes*) per la riduzione della sperimentazione animale e 2) la traduzione di tale approccio sperimentale in un *kit* disponibile al commercio e facilmente utilizzabile. All'interno del progetto l'UO ISS2 coordinerà il *WorkPackage1 "End points"*, con l'obiettivo di definire gli effetti tossici da monitorare in un tessuto altamente specializzato come la retina rilevanti per la valutazione di sicurezza e di biocompatibilità dei materiali selezionati per lo studio, che proprio con tale tessuto sono a contatto in seguito al loro uso clinico. La UO ISS2 contribuirà inoltre alla caratterizzazione

Risultati attesi nel triennio

Studio e sviluppo di una strategia sperimentale *in vitro* affidabile e predittiva della biocompatibilità e sicurezza d'uso degli AVS prima del loro uso clinico, attraverso l'uso di modelli sperimentali avanzati ma che al tempo stesso contraggano tempi e costi della sperimentazione richiesta per la certificazione.

Proposta per il prototipo di un *kit* commerciale (*user-friendly and cost-effective*) che sfruttando la suddetta strategia possa fornire risultati attendibili.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di una strategia che permetta un miglioramento della predittività di sicurezza degli AVS prima del loro uso clinico, rispetto a quella attualmente in vigore, oltre alla riduzione dei tempi, dei costi e del numero di animali utilizzati, potrebbe facilmente essere trasferita agli Enti di normazione (es.UNI) per la definizione di una procedura armonizzata da utilizzare nell'ambito della certificazione di marchio CE. In questo modo aumentando la sicurezza d'uso dei dispositivi oggetto di studio ne beneficerebbe la popolazione in primis e il SSN per una riduzione di costi dovuti alla mancanza di reazioni avverse conseguenti all'uso di materiali non completamente privi di effetti collaterali. Le indicazioni per approntare un prototipo e successivamente sviluppare un *kit* 'diagnostico' commerciale potrà essere trasferito a piccole e medie industrie interessate alla sua produzione e commercializzazione.

Valorizzazione del prodotto ittico nazionale mediante tipizzazione geografica dell'esposizione ambientale a microcontaminanti, della composizione acidica delle carni, e delle condizioni di benessere delle specie allevate

Obiettivi del progetto

Caratterizzazione del prodotto ittico nazionale (selvatico e d'allevamento) mediante analisi geo-referenziate per quanto riguarda la presenza di contaminanti tossici persistenti in pesci a differente livello trofico, e correlazione con parametri di benessere animale e merceologici.

Programma d'attività e metodi

Identificazione delle zone oggetto di studio; piani di campionamento; messa a punto dei metodi per il rilevamento dei composti d'interesse; esecuzione degli accertamenti; elaborazione dei risultati; disseminazione dei risultati.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione ambientale di differenti zone di pesca e/o allevamento, incluse le zone di *baseline*, in base ai profili di contaminazione e ai parametri merceologici e di benessere rilevati in prodotti ittici a differente livello trofico.

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità e ricadute

Sinergie con istituti di ricerca e di controllo nell'ambito dello studio dei contaminanti tossici persistenti. Acquisizione di conoscenze per percorsi consolidati di valutazione e gestione del rischio nel prodotto ittico, sia in sede internazionale che nazionale.

Collaborazioni esterne

Istituto Zooprofilattico Sperimentale (Roma); CNR Venezia; Università di Bologna, Facoltà di Agraria (Bologna); Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" (Milano)

Valutazione del rischio di trasferimento al mais destinato all'alimentazione del suino di antibiotici contenuti nei liquami impiegati a fini fertirrigui

Campionamento dei suoli a inizio monitoraggio: in fase di preparazione dei vasi si otterranno campioni medi omogenei per ogni ripetizione, da destinare alle analisi per la caratterizzazione iniziale completa dei suoli. I liquami che si distribuiranno verranno preliminarmente caratterizzati con analisi di laboratorio per determinarne il contenuto di azoto e tetracicline. Nei vasi verranno distribuite in maniera omogenea quantità misurate di liquame, per dosare le quantità di azoto definite. Il campionamento dei liquami per le analisi delle tetracicline verrà effettuato in fase di distribuzione e dopo omogeneizzazione della quantità totale utilizzata. Le tetracicline saranno determinate su campioni di radici, fusti, foglie, tutoli e granella prelevate da piante rappresentative di ogni vaso, in momenti diversi dello sviluppo vegetale e alla maturazione.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di metodi analitici atti a valutare il destino ambientale delle tetracicline una volta immesse nei terreni agricoli

Trasferibilità dei risultati

Valutazione dell'impatto ambientale di attività connesse con l'allevamento suino intensivo, nell'ambito della Direttiva 96/61/CE del Consiglio del 24 settembre 1996 sulla prevenzione e la riduzione integrate dell'inquinamento Gazzetta Ufficiale n. L 257 del 10/10/1996 pag. 0026 - 0040

Valutazione del rischio igienico-sanitario connesso a esposizione a rifiuti dei residenti in prossimità di discariche e/o siti di smaltimento abusivo

Sempre più si sta diffondendo nella popolazione una preoccupazione inerente le problematiche dello smaltimento dei rifiuti. Ancora di più detta preoccupazione cresce tra i residenti in prossimità di siti di trattamento e/o smaltimento dei rifiuti (discariche/inceneritori).

Tale percezione del rischio spesso è associabile a disturbi quali maleodori e deturpazione del paesaggio e depauperazione di risorse ambientali.

Lo studio, che verrà condotto in stretta connessione con il Reparto di Epidemiologia Ambientale del Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria e in collaborazione esterna con l'OMS – Centro Salute e Ambiente di Roma e con il CNR di Pisa Istituto di Fisiopatologia, riguarderà soprattutto alcune aree della Regione Campania, in particolare in base ad una specifica richiesta (nel 2005) della Protezione Civile, verrà condotto su tutti i Comuni e delle Province di Napoli e Caserta. Verranno raccolti dati inerenti la presenza di siti di smaltimento autorizzato e non e la presenza di altre forzanti ambientali, quali impianti trattamento rifiuti, trattamento acque, industrie, allevamento, spandimento fanghi in agricoltura, ecc. Verrà poi formulato il Modello Concettuale del sito e effettuata una prima valutazione del rischio.

Contestualmente il Reparto di Epidemiologia Ambientale effettuerà sugli stessi siti una indagine a carattere epidemiologico.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si prefigge l'obiettivo dichiarare per alcune aree del territorio campano particolarmente problematiche il nesso casuale "esposizione a rifiuti e rischio igienico-sanitario".

Inoltre un ulteriore obiettivo è la predisposizione di un "protocollo" inerente le modalità con cui svolgere tali studi a carattere sia ambientale che tossicologico.

Trasferibilità dei risultati

Elaborazione di criteri univoci per l'allocazione di siti di smaltimento di rifiuti non pericolosi e pericolosi, che possono essere utilizzati da tutti coloro i quali sono chiamati a prendere decisioni in merito.

Individuazione di modalità idonee di comunicazione degli rischi igienico-sanitario alla popolazione e agli addetti.

Valutazione del rischio sanitario associato alla contaminazione ambientale da alchilfenoli e loro etossilati

L'obiettivo di questa attività di ricerca è quello di valutare l'entità dell'esposizione agli alchilfenoli, dovuta in particolare al consumo di prodotti ittici.

Per raggiungere questo obiettivo sarà condotta un'indagine analitica per determinare i livelli di alchilfenoli in prodotti ittici dei mari italiani e di laghi di interesse commerciale. Saranno inoltre effettuate analisi su campioni biologici umani, in particolare di tessuto adiposo di soggetti con patologie dovute a disfunzioni del sistema endocrino.

I prodotti ittici marini saranno prelevati da alcuni porti della costa adriatica e di quella tirrenica. I porti saranno individuati sulla base della loro collocazione rispetto all'immissione in mare di corpi idrici provenienti da aree dove sono presenti attività industriali che utilizzano quantitativi considerevoli di alchilfenoli etossilati. I prodotti ittici da esaminare dovranno comprendere almeno una specie di molluschi, una di crostacei e una di pesci.

In relazione alle acque interne, saranno campionati organismi di interesse commerciale in due laghi, che sulla base dell'esame delle informazioni disponibili, mostrano di essere recettori di scarichi di insediamenti industriali che utilizzano gli alchilfenoli etossilati.

I campioni prelevati saranno estratti e analizzati per i contenuti di AF e APE con metodi GC/MS e HPLC/MS.

I risultati ottenuti saranno utilizzati per stimare l'esposizione delle popolazioni potenzialmente interessate e per valutarne il rischio sanitario.

Risultati attesi nel triennio

Nel corso del triennio saranno completate le indagini sopra descritte riguardanti le specie ambientali e i tessuti biologici. I dati ottenuti saranno utilizzati per stimare l'esposizione delle popolazioni potenzialmente interessate: ad esempio, popolazione generale, forti consumatori di prodotti ittici, donne in stato di gravidanza. Sulla base di queste stime sarà effettuata la valutazione del rischio sanitario per le diverse categorie di popolazione considerate.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche

Rapporti tecnici con descrizione dell'approccio metodologico applicato

Valutazione del rischio sanitario associato all'esposizione alle cianotossine nel Lago di Gerosa

L'obiettivo specifico di questa attività di ricerca è quello di avviare una nuova ricerca per studiare e valutare il rischio sanitario associato alla presenza di cianobatteri nel Lago di Gerosa

(AP). Per raggiungere questo obiettivo saranno caratterizzate le cianotossine e individuate, in collaborazione con l'ARPA delle Marche, le principali specie che le producono. Saranno infine esaminate le condizioni ambientali che favoriscono le fioriture di cianobatteri tossici. Le attività di caratterizzazione chimica e quantificazione saranno effettuate con tecniche HPLC-MS e *kit* immunoenzimatici.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base dei dati analitici riguardanti i livelli delle principali cianotossine nel Lago di Gerosa saranno condotte attività di valutazione del rischio in relazione alle diverse tipologie di fruizione di queste acque.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche

Valutazione del rischio sanitario e ambientale associato alla presenza di metaboliti derivanti da prodotti fitosanitari, in uso e di nuova immissione nel mercato italiano, potenzialmente rilevanti per l'ambiente idrico

La presenza di prodotti fitosanitari e di alcuni loro metaboliti nelle acque superficiali e sotterranee è comprovata da oltre trenta anni di attività di monitoraggio in diversi paesi dove sussistono attività agricole di tipo intensivo. Nel nostro paese, le indagini condotte dalle Strutture di controllo locali indicano che alcuni fitofarmaci e loro metaboliti possono raggiungere e superare i limiti di legge previsti dal DL.vo 31/2001 e successivi aggiornamenti, che riguarda la protezione delle acque potabili. Secondo il Decreto, i fitofarmaci e quei metaboliti ritenuti rilevanti sono vincolati alle medesime CMA di 0.1 e di 0.5 µg/l definite per le sostanze singole e totali (Allegato 1, Parte B, nota 6 nel DL.vo 31/2001). Dalle esperienze pluriennali condotte sull'aspetto della contaminazione dei corpi idrici e sui processi di contaminazione dovuti a tali sostanze, maturate attraverso Progetti specifici pregressi, si può constatare che i dati relativi ai controlli delle acque non sono sufficienti a rappresentarne lo stato qualitativo per i seguenti principali motivi: i) liste di monitoraggio non adeguate rispetto alle effettive pressioni dei composti utilizzati in agricoltura o in determinate attività civili, ii) scarsa conoscenza delle pressioni e dell'impatto ambientale dei prodotti fitosanitari di recente introduzione sul mercato sulla base dell'Allegato I della Direttiva 91/414/CEE e i corrispondenti recepimenti italiani, iii) carenza di dati di monitoraggio relativi ai metaboliti a causa di difficoltà oggettive relative alla selezione, tra le svariate decine di possibili candidati, dei composti più significativi dal punto di vista sanitario e ambientale, iv) carenza di metodiche analitiche per le acque in particolare per i prodotti nuovi e in generale per i metaboliti e mancanza di composti di riferimento (*standard* analitici) su cui testare e/o sviluppare i metodi, in particolare nel caso dei metaboliti.

Risultati attesi nel triennio

Questa attività di ricerca si pone, in primo luogo, l'obiettivo di accertare lo stato di contaminazione dovuto ai metaboliti dei fitofarmaci in acque sotterranee e superficiali del nostro e di altri paesi, di aggiornare le conoscenze sui metaboliti più significativi dal punto di vista sanitario e ambientale giungendo all'identificazione dei metaboliti prioritari per la realtà italiana, e di estendere, per quanto possibile, le conoscenze sui metaboliti di fitofarmaci di nuovo impiego, considerando le immissioni di prodotti nell'ultimo decennio. In secondo luogo, si propone di identificare un congruo numero di metaboliti prioritari per le varie realtà territoriali italiane da proporre per indirizzare le indagini nei corpi idrici attraverso il consolidato approccio metodologico di: a) acquisizione di dati di vendita delle sostanze parentali tradizionali e nuove, b) acquisizione e aggiornamento di dati sulle proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche dei metaboliti di sostanze parentali tradizionali e, se

del caso, di sostanze nuove, e di dati sul potenziale di contaminazione di acque sotterranee, superficiali e di sedimenti con eventuale studio in laboratorio dei casi più interessanti secondo procedure consolidate, c) raccolta e studio delle metodiche analitiche esistenti relative ai metaboliti prioritari d) eventuale ricerca di metaboliti prioritari in corpi idrici, anche in collaborazione con Strutture di controllo locali e Istituti universitari italiani e esteri e, se del caso, di approcci alla valutazione del rischio a seguito di esposizione degli organismi acquatici e dell'uomo secondo le procedure Comunitarie e internazionali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di queste attività saranno utilizzati per implementare le conoscenze sui rischi derivanti dalla contaminazione potenziale ed effettiva dei corpi idrici e delle altre matrici connesse e per implementare, in modo ragionato e scientificamente rigoroso, le attività di monitoraggio condotte nel nostro paese nei confronti di sostanze poco conosciute e difficilmente ricercate, come sono i metaboliti dei prodotti fitosanitari, ma di possibile rilevanza tossicologica e che possono pesare in maniera negativa sullo stato qualitativo dei corpi idrici. A tal fine si prevedono cicli di seminari e di corsi interni e esterni sull'argomento, già attivati in questi ultimi anni, in collaborazione con le competenze presenti nel nostro nel nostro Istituto e in Italia, anche allo scopo di sensibilizzare le Autorità e i Laboratori preposti al controllo del patrimonio idrico. Sono inoltre previste pubblicazioni divulgative di carattere tecnico, come rapporti e linee-guida, e di carattere scientifico con pubblicazioni di levatura internazionale.

Valutazione delle emissioni, dei livelli di ricaduta e dell'impatto ambientale dell'impianto di termodistruzione dei rifiuti "Fenice" sito in località S. Nicola di Melfi (PZ)

Rilevamento emissioni inceneritore: 4 campagne di rilevamento di microinquinanti (8 campionamenti) da effettuarsi nel corso di 16-24 mesi.

Continuazione dei rilevamenti, per un periodo di 24 mesi, presso le postazioni già attivate nella parte pregressa della Convenzione e potenziamento della postazione "Lavello" con installazione di un campionatore per PM_{2,5} e di un campionatore ad alto volume per microinquinanti organici.

Per quanto riguarda le matrici ambientali si prevedono campionamenti di latte ovino, caprino e vaccino e di uova negli stessi siti già sottoposti a tali prelievi e intensificando i prelievi in quei siti di particolare interesse (60-80 campioni).

Risultati attesi nel triennio

Costruire una "Banca Dati" in cui organizzare e rendere fruibili le numerose informazioni raccolte, effettuando anche delle elaborazioni statistiche per evidenziare eventuali correlazioni tra dati ambientali di natura diversa ;

Valutare l'esposizione della popolazione ai contaminanti considerati,effettuando altresì un'analisi comparativa degli apporti dovuti ai diversi e possibili scenari espositivi tutto ciò al fine di avere a disposizione un valido supporto per la valutazione dello stato dell'ambiente e per la programmazione di eventuali interventi correttivi.

Trasferibilità dei risultati

I risultati consentiranno di mettere in atto politiche ambientali di sorveglianza dei fenomeni di contaminazione e di progettare le relative azioni di mitigazione.

Valutazione delle emissioni, dei livelli di ricadute e dell'impatto ambientale dell'impianto di termodistruzione dei rifiuti "Fenice". Protocollo per lo studio dei microinquinanti organici nell'area industriale di S. Nicola di Melfi. Convenzione ARPAB-ISS

Fornire elementi per una puntuale stima/gestione del rischio tossicologico associato alla contaminazione persistente dell'ambiente terrestre e del prodotto alimentare destinato all'alimentazione umana in un'area sotto impatto di un impianto di termodistruzione. In particolare verranno effettuati: a) rilevamento delle emissioni in relazione alle componenti d'inquinamento chimico selezionate; b) rilevamento della contaminazione nel materiale particolato (es. PM10, PM2.5) nell'aria, nel suolo superficiale, e in indicatori ambientali (incluso il biota); c) riscontro della presenza dei contaminanti in oggetto in prodotti alimentari locali a uso umano e/o zootecnico; d) modellizzazione dell'impatto/destino ambientale dei contaminanti d'interesse; e) valutazione dell'esposizione umana *multipathway* (es. inalatoria, alimentare); f) definizione e formulazione (protocolli procedurali) di metodiche analitiche di rilevamento; g) formazione del personale.

Risultati attesi nel triennio

Rilevamento dei contaminanti citati nelle emissioni termiche (specifiche), nel suolo superficiale, nell'atmosfera, e nel biota. Analisi dell'impatto ambientale differenziale dei fattori di rischio d'interesse, anche in relazione alle caratteristiche d'area. Modellizzazione del destino ambientale. Definizione degli scenari d'esposizione della popolazione generale, eventualmente anche per sottopopolazioni. Valutazione integrata del rischio tossicologico. Elaborazione di criteri di gestione/riduzione del rischio, laddove richiesto. Determinazione dei livelli ambientali di fondo (*baseline*) di contaminanti ubiquitari.

Trasferibilità dei risultati

Sinergie con gli enti locali, formazione del personale, trasferimento di *know-how* scientifico e di metodi analitici sofisticati.

Woman, health, alcohol. risks and damages from alcohol in different woman ages: the role of abuse markers

Il progetto si svolge in collaborazione con il National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA-NIH) nell'ambito degli accordi di collaborazione Italia-USA. Lo scopo è monitorare e valutare gli effetti avversi dell'alcol sulla salute della donna. Le abitudini delle donne sono oggi profondamente cambiate e vi è una tendenza a consumi alcolici a rischio simili a quelli degli uomini. L'ipotesi di differenze di genere e di problemi alcolologici femminili più gravi rispetto a quelle maschili è supportata da studi e ricerche. Aumento dei consumi, abbassamento dell'età di primo uso, rischio di effetti teratogeni e carenza di studi di genere giustificano lo studio degli effetti dell'alcol nella donna. Considerata la complessità dell'azione dell'alcol, l'approccio del progetto è multidisciplinare. Sono coinvolte cinque Unità Operative (Biochimica, Ormonale, Immunologica, Tossicologica, Neuro-Comportamentale) per studi clinici in alcolisti cronici, e per ricerche *in vitro* e di sperimentazione animale. Sono valutate anche le interazioni ambiente/stili di vita e i possibili effetti sinergici dovuti ad esposizione simultanea ad alcol e contaminanti ambientali. Particolare attenzione è data allo studio dell'effetto teratogeno dell'alcol, ad oggi sicuramente sottostimato e legato all'uso anche moderato di alcol in gravidanza. Sviluppo delle conoscenze scientifiche e divulgazione dell'informazione possono supportare efficacemente la prevenzione di danni irreversibili nella prole

Risultati attesi nel triennio

Individuazione e valutazione di bioindicatori del danno da alcol in relazione al genere e alle diverse fasce di età. L'abuso alcolico sottende molte patologie ma, ad oggi, non sempre viene clinicamente riconosciuto. Soprattutto per quanto riguarda i problemi femminili, l'introduzione di nuovi bioindicatori potrebbe fornire ulteriori e più efficaci strumenti di diagnosi, prognosi e monitoraggio del trattamento. La disponibilità di *markers* efficaci risulta particolarmente utile in gravidanza per evidenziare consumi alcolici a rischio. Gli studi di messa a punto metodologica hanno l'obiettivo di rendere disponibili procedure analitiche nuove e/o significativamente migliorate in termini di affidabilità e di praticabilità. Dagli studi in corso ci si attende il miglioramento delle conoscenze: dei meccanismi d'azione dell'alcol; del perché il danno alcolico risulta più grave e con progressione più veloce nella donna; degli effetti dell'alcol in relazione ad età, sesso, dose e modalità di assunzione; dei meccanismi d'azione dell'esposizione prenatale ad alcol e degli effetti fisici e comportamentali che si manifestano nel corso della crescita del bambino. Obiettivo è anche ampliare le conoscenze, ad oggi estremamente carenti, sull'interazione alcol/contaminanti ambientali e sugli effetti negli alcolisti di esposizione ambientale a concentrazioni di contaminanti considerate sicure per organismi in buona salute.

Trasferibilità dei risultati

In accordo con la missione dell'ISS, il Progetto affronta un problema di grande rilevanza per la salute pubblica. Lo studio del misuse di alcol nella donna investe campi particolarmente delicati dal punto di vista sanitario e sociale e i risultati conseguiti dovranno avere la massima trasferibilità. In campo clinico, l'uso di bioindicatori mirati può essere di aiuto per diagnosticare il danno da alcol e per indirizzare il trattamento. Nell'ambito dell'informazione ed educazione alla salute, saranno organizzati degli incontri per gli operatori sanitari e sociali e iniziative per divulgare il più possibile i rischi del bere eccessivo. Tali rischi sono particolarmente elevati per la donna, soprattutto se in giovane età. Particolare attenzione verrà posta alla trasferibilità e divulgazione degli studi sui rischi dell'uso di alcol in gravidanza quando anche un bere moderato può causare danni irreversibili al nascituro.

**Dipartimento
Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria**

Attività di controllo, valutazione, parere

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

1. Verifica della conformità dei materiali a contatto con alimenti alle normative nazionali ed europei: 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

Trattandosi di un'attività svolta su richiesta di enti amministrativi e/o privati esterni, non è possibile effettuare una pianificazione rigorosa. La stima basata sull'attività degli anni precedenti è di 350-450 pratiche annue (atti amministrativi firmati) comprendenti valutazioni e controlli anche di tipo sperimentale su materiali a contatto con alimenti, giocattoli, dispositivi medici non attivi (pareri, revisioni di analisi, revisioni di normative tecniche ecc.).

Proseguirà l'attività che comporta l'esame di documentazione tecnica, la ricerca bibliografica, la valutazione scientifica dei dati raccolti e la stesura di un parere scientifico. Nel caso sia svolta attività sperimentale, dopo l'esame della problematica si procederà alla verifica della applicazione di metodi esistenti o allo sviluppo e preconvalida *in house* di nuovi metodi, per effettuare quanto previsto dalla richiesta pervenuta. Verranno quindi emessi giudizi di conformità o pareri tecnico-scientifici.

Nell'ambito delle attività relative al rilascio delle certificazioni CE ai sensi della Dir. 93/42/CEE, verranno effettuate anche nel prossimo triennio, verifiche ispettive presso fabbricanti di dispositivi medici. L'attività di verifica ispettiva consiste nella valutazione della documentazione predisposta dai fabbricanti e nel sopralluogo degli ambienti adibiti alla fabbricazione.

Sono previste visite ispettive di mantenimento della certificazione (circa 100/anno) e visite ispettive per richieste di nuove certificazioni (quantità annua non prevedibile). L'esito della verifica ispettiva è sempre formalizzato mediante apposito verbale.

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 Documents* in supporto della Direttiva 93/67/EEC e del Regolamento Comunitario 1488/94, in qualità di esperto italiano per la tossicocinetica presso la *European Commission* DG 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

Per il prossimo triennio si prevedono per l'OCSE un totale di 15 linee guida, per l'UE tre normative.

Analisi della presenza di alghe tossiche e delle tossine correlate in campioni di acqua potabile, balenabile o utilizzabile a scopi umani e 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 MinSan. 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

Si proseguirà l'attività di controllo e studio dei fenomeni di fioriture di cianobatteri tossici che possono verificarsi nelle acque lacustri, soprattutto in condizioni eutrofiche e risultare dannose per i bagnanti, soprattutto i bambini. Studio delle relazioni tra territorio e qualità delle acque di balneazione; definizione dei criteri per l'individuazione di aree omogenee e ad elevata criticità; elaborazione di criteri e linee guida per la conduzione di piani di monitoraggio e per il controllo della qualità di acque interessate da fenomeni di proliferazione di alghe tossiche marine e di 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

Non prevedibile. In base alle richieste delle autorità regionali.

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 D.L.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

Nel prossimo triennio 2006-2008 proseguirà l'attività di analisi di revisione per residui di antiparassitari negli alimenti; 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 oltre 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 Az.U.S.L. Nel caso di risultati irregolari l'interessato ha facoltà di chiedere la ripetizione dell'analisi, che sarà effettuata presso l'Istituto Superiore di Sanità. 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 continuerà l'attività di revisione di analisi per i residui di antiparassitari.

Il Ministero della Salute coordina e definisce in Italia i programmi di controllo ufficiale sui prodotti alimentari comprendenti anche i piani annuali in materia di residui di prodotti fitosanitari. Questi ultimi sono parte integrante di un programma coordinato di controllo ufficiale previsto dall'UE su alimenti di produzione interna e di importazione volto a conoscere l'effettiva presenza di residui e a verificare la sicurezza degli alimenti.

Le analisi per la ricerca di residui di antiparassitari vengono effettuate dai Laboratori pubblici (presidi Multizonali di Prevenzione, Agenzie regionali per la Protezione dell'Ambiente e dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali), con il supporto tecnico-scientifico dell'ISS. I Laboratori provvedono a trasmettere i risultati delle analisi per via telematica al Ministero della Salute.

Mediamente nel corso di un anno solare pervengono in ISS circa 100 richieste, per cui si presuppone un totale di circa 300 richieste di revisione di analisi per la ricerca dei residui di antiparassitari nel prossimo triennio.

Attività di valutazione della documentazione presentata a supporto delle domande di registrazione dei prodotti fitosanitari

Su richiesta del Ministero della Salute (DL.vo 194/95) vengono espressi pareri di valutazione della documentazione presentata a supporto delle domande di registrazione dei prodotti fitosanitari, relativamente a identità, proprietà chimico-fisiche, metodi di analisi, e residui di antiparassitari negli alimenti.

Piano triennale

Nel prossimo triennio 2006-2008 proseguirà l'attività consultiva a livello nazionale (CCPF) e internazionale (CE) su problematiche correlate alla identificazione e valutazione della tossicocinetica, del metabolismo e degli effetti tossici degli antiparassitari. Proseguirà anche l'attività Consultiva in ambito internazionale (CE, ECVAM, OECD) sullo sviluppo, validazione e applicazione di metodi di saggio per gli effetti tossici a breve e a lungo termine. Proseguono i piani annuali di controllo sui residui dei prodotti fitosanitari; è previsto un programma dettagliato di attuazione dei controlli in ambito regionale e delle province autonome, con l'indicazione tra l'altro del numero minimo e del tipo di campioni da analizzare. La ripartizione dei campioni per ogni Regione e Provincia Autonoma è calcolata in base ai dati sul consumo e sulla produzione degli alimenti interessati.

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 del SSN preposte al controllo. Determinazioni di contaminanti chimici in matrici di diversa natura su richiesta del NAS e/o della Magistratura.

Piano triennale

Anche nel prossimo triennio le attività finalizzate alla sorveglianza e vigilanza del mercato dei dispositivi medici consisteranno principalmente in:

partecipazione ai gruppi di lavoro in materia di dispositivi medici presso l'Autorità sanitaria competente;

partecipazione all'attività di sorveglianza e vigilanza sul mercato dei dispositivi medici attraverso verifiche ispettive presso mandatarî, fabbricanti, distributori di dispositivi medici in base ad un accordo di collaborazione fra Istituto Superiore di Sanità e Ministero della Salute;

effettuazione di controlli su dispositivi medici oggetto di segnalazione di incidenti o di mancati incidenti al fine dell'elaborazione dei pareri richiesti dall'Autorità sanitaria competente;

controlli su richiesta della Magistratura, NAS e analisi di revisione;

attività ispettiva nell'ambito dell'Organismo Notificato 0373, ai fini della concessione e della sorveglianza della marcatura CE per i dispositivi medici (Dir. CE 93/42);

attività ispettiva in relazione alla convenzione tra ISS e Ministero della Salute (SO.VI.DI.ME.) per lo svolgimento dell'attività di sorveglianza e vigilanza del mercato dei dispositivi medici nell'ambito dell'UE.

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

L'esperienza acquisita nel settore, consentirà di svolgere nel prossimo triennio anche attività di formazione per operatori del SSN e per studenti universitari in corsi organizzati presso l'ISS o con contributi a corsi, convegni e seminari presso altre sedi. Continuerà ad essere 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 sarà 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).

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

Nel prossimo triennio continuerà l'attività svolta negli anni precedenti. Al fine di tutelare i diritti della collettività rispetto ai rischi sanitari connessi all'inquinamento ambientale, risulta indispensabile garantire 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 necessaria altresì, una identificazione territoriale di tutti gli impianti di acquacoltura sia a terra che nel mare aperto utilizzando un sistema informativo geografico, al fine di visualizzare i dati ottenuti in un formato di immediata comprensione. Deve anche essere 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

Nel prossimo triennio si prevede di analizzare circa 80 campioni.

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

Si prevede un totale di 15 campioni da analizzare nel prossimo triennio 2006-2008.

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

Co-ordinatore nazionale del *Test Guidelines Programme* dell'OECD. Il programma — il cui obiettivo è la definizione o l'aggiornamento rispettivamente di nuove e vecchie linee-guida di saggio per la caratterizzazione dei prodotti chimici (inclusi i pesticidi, biocidi, ecc.) — 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.

Piano triennale

Si prevede una riunione nel prossimo triennio.

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 27-29/09/2000.

Piano triennale

Nel prossimo triennio 2006-2008 proseguirà la valutazione sulla sicurezza dei prodotti cosmetici e della preparazione a base di piante medicinali e officinali poiché riveste notevole importanza e attualità in considerazione del fatto che larga parte della popolazione fa giornalmente uso di questo tipo di prodotti. L'approccio sperimentale utilizzato prevede l'uso di metodologie chimiche e di metodi *in vitro*, alternativi alla sperimentazione animale, così come richiesto dalle attuali disposizioni normative comunitarie.

Elaborazione di monografie di valutazione di biocidi già presenti in commercio

Su richiesta del Ministero della Salute vengono elaborate monografie di valutazioni di biocidi già presenti in commercio relativamente all'identità, alle proprietà chimico-fisiche, ai metodi analitici e ai residui (Dir. 98/8/CE, recepita come DL.vo 25 febbraio 2000, n. 174).

Piano triennale

Proseguirà l'attività di elaborazione di monografie di valutazione di biocidi già presenti in commercio.

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

Su richiesta del Ministero della Salute vengono elaborate monografie di valutazione di principi attivi antiparassitari nuovi o già presenti in commercio, ai fini della stima del rischio tossicologico e ambientale, relativamente alle proprietà chimico-fisiche, ai metodi analitici e al comportamento dei residui negli alimenti. (Dir. UE 414/91 recepita con DL.vo 194/95). Tale attività comporta anche la partecipazione a riunioni di valutazione delle monografie elaborate dall'Italia e dagli altri Stati Membri dell'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

Nel prossimo triennio l'attività comporterà 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). Sempre su richiesta del Ministero della Salute, si proseguirà con l'elaborazione di 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).

Emergenza ambientale Fiume Sarno (Prefettura di Napoli)

Monitoraggio dei corpi idrici del sub-comprensorio Alto Sarno. In particolare verificare la presenza di endocrine nelle acque al fine di fornire gli elementi necessari per la valutazione della componente salute, nei processi decisionali.

Piano triennale

Continuerà la collaborazione alla risoluzione delle numerose e complesse problematiche legate al degrado e all'inquinamento provocate dalle antiche attività industriali e dagli insediamenti urbani nel bacino del Sarno e dei suoi tre corsi d'acqua: Cavaioia, Solofrana e Sarno. Il problema coinvolge da numerosi anni una vasta parte dell'opinione pubblica e le Autorità ambientali e sanitarie preposte alla prevenzione e al controllo.

Il piano di risanamento del fiume Sarno ha previsto la realizzazione di poli depurativi per acque urbane o miste (urbane-industriali) per circa 2,4 milioni di abitanti equivalenti, più un polo depurativo destinato esclusivamente al trattamento delle acque reflue prodotte nel comprensorio conciario di Solofra. Con riferimento ai tre comprensori in cui è suddiviso il bacino del fiume Sarno (Alto, Medio e Foce), le attività svolte hanno consentito di raggiungere i seguenti risultati:

Per il Comprensorio Alto Sarno è stato completato e avviato all'esercizio l'impianto di depurazione di Mercato San Severino nel quale confluiscono sia gli scarichi pretrattati del polo conciario di Solofra, sia le acque reflue dei Comuni del comprensorio. Inoltre è stata completata la progettazione degli interventi di rinaturalizzazione del torrente Solofrana e è stata avviata la gara per la realizzazione dei relativi interventi.

Per il Comprensorio Medio Sarno continueranno i lavori di realizzazione dei quattro grandi impianti di depurazione a servizio delle aree urbane e industriali, per complessivi un milione e 200mila abitanti equivalenti e un impegno economico di oltre 350 miliardi. Si è inoltre provveduto alla progettazione preliminare dei collettamenti consortili di tali impianti, per i quali è stata già avviata la gara di progettazione, e alla definizione delle necessità di adeguamento delle reti interne comunali.

Per il comprensorio Foce Sarno è stato trasmesso dalla Regione Campania il progetto dell'impianto esistente di Foce Sarno che dovrà essere ristrutturato per renderlo conforme alle prescrizioni della Direttiva Comunitaria sulle acque reflue urbane, recepita con il Decreto Legislativo 152/99.

Expert Consultation On Endocrine Disrupters Testing In Amphibians, OECD

Nell'ambito della I 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 ECs. 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 ECs, 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 prossimo triennio.

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 14-5-1988 n. 155 e DPR 236 del 24-5-1988 o particolari situazioni di emergenza (18-12-97 Prot. S. 2992/62 bis, 12 Nov.98 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). b) 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

Le attività continueranno a studiare la presenza e diffusione nell'ambiente acquatico di gruppi microbici che possono costituire un rischio per la salute umana. In questo ambito gli studi sono 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 per la determinazione dei micorganismi verranno applicate metodiche colturali tradizionali, metodi rapidi, tecniche immunologiche e procedure di biologia molecolare. Verranno altresì predisposti corsi di formazione per operatori del settore.

Irraggiamento degli alimenti e fototossicità

Si svolge attività legata alla valutazione della tossicità e alla dosimetria biologica di alimenti trattati con radiazioni ionizzanti. Partecipazione a:

Commissione Tecnica dell'ENEA per la Sicurezza Nucleare e la Protezione Sanitaria. Tecnologie di irraggiamento: stato attuale e valutazione tecnico economica di possibili applicazioni industriali;

Joint FAO/IAEA/WHO Study Group on High-dose irradiation, wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy.

Piano triennale

Le ricerche nel prossimo triennio 2006-2008 saranno condotte nell'ambito di progetti nazionali e internazionali quali:

- "ARACNA" - analisi del rischio degli alimenti da contaminanti ambientali (finanziato dal Ministero della Salute);
- "Piani triennali di sorveglianza sanitaria e ambientale sugli effetti dovuti all'uso di prodotti fitosanitari (finanziato dal Ministero della Salute);
- "Effetti sulla salute dei bambini associati ad esposizione a pesticidi e altri contaminanti" (Progetto ISS);
- "Strategie e indicatori innovativi per la valutazione delle interazioni gene-ambiente nei tumori professionali tumorali" (finanziato dal Ministero della Salute);
- "Optimisation and pre-validation of an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity" (Progetto UE);
- "Approcci per l'identificazione e la registrazione di alterazioni indicative di immunotossicità in studi di tossicità di tipo regolatorio" (Progetto ISS).

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 27/2/1997). 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

Nel prossimo triennio proseguirà l'attività che comprende l'analisi della documentazione congiuntamente agli altri membri della squadra ispettiva, l'ispezione *in loco* (2-3 giorni) e la preparazione del verbale. Alle ispezioni si affianca l'attività di formazione attiva durante gli annuali corsi di aggiornamento per ispettori e esperti organizzati dall'ISS. La Commissione di Coordinamento composta da membri del Ministero e dell'ISS svolgerà questi incarichi:

- assegnazione delle visite ispettive a un *team* composto da un ispettore e da uno o più esperti;
- analisi dei verbali e decisione in merito alla concessione della certificazione.

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 laboratorio sarà impegnato in uno studio degli ecosistemi acquatici strettamente interconnessi con il refluo liquido

proveniente da un impianto di trattamento di rifiuti radioattivi. Il refluo dovrà essere immesso nel corpo idrico recettore previo trattamento depurativo e dovrà rispettare i parametri di legge (DL.vo 152/99 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

Molte sostanze chimiche, soprattutto in prossimità degli scarichi industriali, raggiungono l'ambiente acquatico dove possono causare danni agli organismi acquatici o alla salute dell'uomo attraverso il consumo di organismi acquatici e di acqua. Alcuni contaminanti "emergenti", come i farmaci e i composti che possono interferire con le attività ormonali, hanno anche attirato l'attenzione della comunità scientifica per i possibili effetti che possono causare agli organismi acquatici e alla salute dell'uomo. Per far fronte a questa complessa problematica, a livello europeo, viene perseguita una strategia definita principalmente con la direttiva quadro sulle acque (Dir.2000/60), il cui elemento fondamentale di tale strategia è rappresentato dall'individuazione delle sostanze prioritarie e dalla definizione degli *standard* di qualità per la protezione degli organismi acquatici e della salute umana. Per questo le attività di controllo e 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. Nelle priorità ambientali individuate dagli organismi internazionali, in particolare dall'UE, vengono poste le attività di prevenzione primaria attraverso la salvaguardia e la conservazione dell'intero ecosistema. L'approccio ecotossicologico consente una valutazione integrata della qualità dei corpi idrici superficiali, fornendo un'informazione specifica e complementare a quella chimica e biologica.

Partecipazione alla revisione delle *guidelines* europee per la cancerogenesi

Partecipazione alle riunioni della Comunità Europea per la stesura delle nuove *guidelines* 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:

attività consultiva nel gruppo *ad hoc* di esperti e nel Gruppo di coordinamento sullo (Q) SAR dell'OECD;

attività consultiva nel gruppo *ad hoc* di esperti sulla tossicogenetica in ambito OECD. Inoltre è stata avviata e continuerà ad essere aggiornata, la base di dati Cancerogeni chimici: struttura e dati sperimentali, con lo scopo di servire come sistema di supporto alle decisioni degli esperti.

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

Delegato nazionale del Ministero dell'Ambiente e/o dell'Istituto, con frequente funzione di Capo-delegazione, al Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on

Chemicals, Pesticides, and Biotechnology (Health and Safety Division, Environment Directorate, OECD). Gli argomenti trattati riguardano in senso generale la gestione del rischio chimico in relazione ai saggi di caratterizzazione (Test Guidelines Programme), ai prodotti chimici esistenti, a quelli di nuova produzione, ai pesticidi, ai biocidi, all'eliminazione dei rifiuti, alla sicurezza dell'industria chimica ("legge Severo"), 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

Si prevedono due riunioni 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 a 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 prossimo triennio 2006-2008 si approfondirà su base informatizzata 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 è di supporto in ambito normativo nei vari progetti di legge nazionali che prevedono liste di piante. L'attività futura si inserisce nell'ambito del Progetto ISS "Prodotti a base di piante officinali: attività bioconservante e antimicrobica".

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 della Salute 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 ai fini dell'identificazione del pericolo, della valutazione del rischio e dell'elaborazione di linee guida per la sperimentazione tossicologica e clinica di fase I. In particolare si svolgerà:

attività consultiva a livello nazionale (Commissione Consultiva Prodotti Fitosanitari, CSS) e internazionale (CE, EFSA) su problematiche correlate alla identificazione e valutazione degli effetti genotossici e cancerogeni delle sostanze chimiche;

attività consultiva a livello nazionale sulla valutazione tossicologica di nuovi prodotti e nuovi ingredienti alimentari;

attività consultiva in ambito internazionale (CE, OECD) sullo sviluppo, la validazione e l'applicazione di metodi di saggio per gli effetti genotossici e cancerogeni;

attività consultiva a livello nazionale (Commissione Comma C) e internazionale (EMEA) relativa all'innocuità di prodotti farmaceutici di nuova istituzione;

attività di consulenza nella preparazione delle linee guida per la sperimentazione clinica di fase I con prodotti per la terapia genica e cellulare somatica.

Sostanze e preparati pericolosi

Valutazione di notifiche di nuove sostanze chimiche, ai sensi del DL.vo. 52/97. Elaborazione e aggiornamento di schede monografiche per l'Inventario Nazionale Sostanze Chimiche. Elaborazione, manutenzione e aggiornamento dell'Archivio dei Preparati pericolosi, ai sensi del DM 19/04/2000. Valutazione dei Presidi Medico Chirurgici disinfestanti. Classificazione di pericolo dei Presidi Medico Chirurgici disinfestanti. Classificazione di pericolo di sostanze chimiche nuove e esistenti. Coordinamento dell'attività dei Centri Antiveneni nazionali Pareri sulla pericolosità di sostanze e preparati. Analisi di controllo e analisi di revisione di sostanze e preparati pericolosi ai sensi del DL.vo. 52/97 e del DL.vo 285/98.

Piano triennale

Nel triennio 2006-2008 continueranno ad essere attivi:

-l'archivio preparati pericolosi; - l'Inventario Nazionale delle Sostanze Chimiche; -la Banca Dati Classificazioni Cancerogeni. Proseguirà l'attività di controllo, revisione di analisi, ispezioni, valutazioni di rilevanza sul piano sanitario, partecipazione a riunioni e incontri tecnici sia in ambito nazionale che internazionale, soprattutto comunitario. L'attività di ricerca sarà indirizzata a supportare valutazioni volte a fornire consulenza all Ministero della Salute e agli Enti regionali.

Valutazione del rischio igienico-sanitario e ambientale in alcune aree della Regione Campania con particolare riguardo agli impianti di smaltimento rifiuti e acque reflue

L'attività proposta si prefigge i seguenti obiettivi principali:- individuazione e valutazione dei siti di smaltimento RSU attivi e/o dismessi, autorizzati e/o abusivi presenti nella regione Campania; - caratterizzazione dal punto di vista ambientale dei siti di smaltimento RSU di cui sopra;- valutare l'alterazione di alcune componenti ambientali, e in particolare il "comparto acque sotterranee", a seguito dell'attività di discarica RSU;- individuazione e valutazione della vicinanza degli impianti alle abitazioni;- analisi dei dati di mortalità per causa disaggregati a livello comunale;- analisi dei dati di malformazioni congenite in bambini nati da residenti in prossimità di discariche di RSU.- analisi della distribuzione geografica della residenza dei nati con malformazioni congenite nelle aree limitrofe i siti di discarica e confronto con la distribuzione di un opportuno campione di controllo (nati normali).

Piano triennale

Proseguirà anche nel prossimo triennio l'attività attraverso la stesura di specifici pareri (su richiesta del Ministero della Salute e dell'Ambiente) e partecipazione a gruppi di lavoro e commissioni. Verrà inoltre 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 rifiuti in genere. In particolare vengono effettuati numerosi sopralluoghi in discariche situate nelle varie Province italiane, soprattutto in Campania, in merito alla emergenza sanitaria e ambientale verificatasi in quella regione nel settore dello smaltimento dei rifiuti solidi urbani e

assimilabili (fanghi, ecc.). Verranno anche effettuate valutazioni e determinazioni analitiche finalizzate alla classificazione dei rifiuti in merito alla loro pericolosità.

Valutazione del rischio, pareri, linee-guida, ispezioni per gli aspetti ecotossicologici di varie classi di sostanze chimiche

In qualità di esperti in tossicologia, si svolge un'attività a livello nazionale e internazionale di valutazione, parere e ispezione in vari ambiti. È attiva la collaborazione con l'OCSE nell'ambito del "Test Guideline Program" relativamente alla definizione di metodi sperimentali ecotossicologici e alla loro validazione. È altresì attiva la collaborazione con il Ministero della Salute e si effettuano ispezioni ai Centri di saggio per la verifica di conformità alle Buone Pratiche di Laboratorio per i saggi ecotossicologici.

Piano triennale

È previsto che venga proseguita l'attività, a livello nazionale e internazionale di valutazione, di valutazione, parere e ispezione che viene svolta in vari ambiti, in qualità di esperti in ecotossicologia. Tra l'altro proseguirà la collaborazione, ormai decennale, nell'ambito del "Test Guideline Program" dell'OCSE relativamente alla definizione di metodi sperimentali ecotossicologici e alla loro validazione, partecipando inoltre a *workshop* su problematiche emergenti. Si prevede la partecipazione ai lavori del "Validation Group for Ecotoxicological Test Methods for Endocrine disruptors", di recente formazione; - partecipazione ai vari gruppi di lavoro della Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari, per l'esame della documentazione tecnico-scientifica mirata alla stesura e valutazione di monografie, all'autorizzazione dell'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari (o al suo rinnovo), alla definizione di linee guida per la valutazione del rischio ambientale; - attività di valutazione del rischio è stata svolta anche per le sostanze chimiche esistenti in applicazione del Regolamento 93/793, ed è previsto che si estenderà anche alla classe dei biocidi, in applicazione al recepimento della relativa Direttiva comunitaria; - si proseguirà la collaborazione con il Ministero della Salute, già iniziata da alcuni anni, nelle ispezioni ai Centri di saggio per la verifica di conformità alle Buone Pratiche di Laboratorio per i saggi ecotossicologici.

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

Monitoraggio futuro e controllo sugli inquinanti attualmente inseriti nella normativa nazionale e che presentano limiti di obbligo: biossido di zolfo, biossido di azoto, ossidi di azoto, materiale particolato totale, piombo, benzene, monossido di carbonio, fluoro, idrocarburi non metanici, ozono, benzo (a)pirene. L'attività sarà centrata sulla valutazione del rischio sanitario associato agli attuali livelli di esposizione e sulla definizione di opportune misure di riduzione della contaminazione, comporterà la revisione e preparazione di documenti, la partecipazione a Gruppi di Lavoro nazionali e internazionali (Gruppi di Lavoro EU, almeno 4 incontri all'anno, della durata media di tre giorni ciascuno; incontri internazionali di tipo negoziale: almeno 5

incontri all'anno, della durata media di 5 giorni ciascuno). A questo tipo di attività, per la quale è prevista la continuazione nel prossimo triennio, si è recentemente aggiunta la partecipazione al Comitato di raccordo per l'implementazione della "Convenzione di Rotterdam sul *Prior Informe Consent*" e la "Convenzione di Stoccolma UNEP-POPs", attivato dal Ministero degli Affari Esteri.

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

Proseguirà l'attività che 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. Per consentire una più agevole e omogenea raccolta dei dati il globo è stato diviso in aree geografiche che raggruppano più Paesi; l'Italia fa parte della Regione IV, Mediterraneo. L'ISS ha il compito di individuare e coordinare gli Esperti Nazionali specifici per sostanza chimica e per i vari settori d'interesse per il Progetto, di coordinare la raccolta dei dati da essi forniti e di valutarne la qualità.

Valutazione di metodi di tossicità *in vitro*

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

Piano triennale

Proseguirà nel triennio 2006-2008 l'attività di ricerca in questo settore, volta all'identificazione e validazione di metodi alternativi e alla standardizzazione di protocolli per applicazioni a scopo regolatorio e/o di ricerca, per l'individuazione dei meccanismi di tossicità di sostanze naturali e di sintesi e per l'identificazione di biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità.

Valutazioni di rischio da aromatizzanti

L'attività si svolge all'interno dello SCOOP *Working Group on Flavourings* (gruppo di lavoro sugli aromatizzanti all'interno del Comitato Scientifico della Unione Europea). Si tratta di attività di valutazione di rischio per esposizione ad aromatizzanti, basate oltre che sulle proprietà metaboliche e tossicologiche anche sui dati di produzione e dei livelli di esposizione reali in Europa. L'attività comprende sia valutazioni di gruppi di aromatizzanti a struttura chimica simile, che di singoli prodotti utilizzati in campo alimentare. È prevista la creazione di un database di sostanze aromatizzanti.

Piano triennale

Le attività riguarderanno:

attività consultiva a livello nazionale (Commissione Consultiva Prodotti Fitosanitari e Commissione Nazionale Biocidi) e internazionale (Commissione Europea, EFSA) su problematiche correlate alla identificazione e valutazione della tossicocinetica, del metabolismo e degli effetti tossici delle sostanze chimiche (pesticidi, biocidi, contaminanti ambientali e della

catena alimentare, aromatizzanti ad uso alimentare, cosmetici, sostanze di origine naturale) e sulla loro classificazione ai fini dell'etichettatura e imballaggio;

attività consultiva in ambito internazionale (CE, ECVAM, OECD) sullo sviluppo, validazione e applicazione di metodi di saggio per gli effetti tossici a breve e lungo termine.

L'attività prevista nel prossimo triennio, riguarderà la valutazione di circa 5000 aromatizzanti.

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) e 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 6 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

I piani di monitoraggio che hanno cadenza annuale e vengono realizzati dai Laboratori del SSN, costituiscono la base per il calcolo della esposizione giornaliera (EI= *Estimated Daily Intake*), che è uno dei parametri per la valutazione dell'esposizione tramite la dieta. il rapporto tra EI e ADI (*Acceptable Daily Intake*) servirà ad evidenziare eventuali situazioni di attenzione e, quindi, ad indirizzare i piani di sorveglianza e di monitoraggio degli anni successivi verso il controllo di alimenti più a rischio e a suggerire l'adozione di eventuali misure di rettifiche normative alla Commissione ministeriale per i prodotti fitosanitari presso il Ministero della Salute.

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

Sono tra le attività preveibili: Sostanze chimiche esistenti (membro del gruppo di Esperti dell'ISS per la Valutazione del rischio delle sostanze chimiche esistenti - attuazione regolamento UE 793/93) Autorizzazioni in deroga alla sperimentazione animale (Pareri di congruità ai disposti del DL.vo 116/92 di progetti di ricerca che prevedono sperimentazione *in vivo*) Sostanze tossiche persistenti (membro del programma UNEP-*United Nations Environmental Programme* per la loro riduzione e/o eliminazione delle emissioni).

**Dipartimento
Biologia Cellulare e Neuroscienze**

Attività di ricerca

“Studio degli effetti sulla salute umana dell’esposizione a distruttori endocrini con azione tireostatica”

Gli studi condotti in questi ultimi anni per accertare l’effetto dei distruttori endocrini sulla salute umana hanno dimostrato che la tiroide è un organo particolarmente sensibile all’azione di queste sostanze. Nonostante le numerose informazioni derivanti da osservazioni rilevate soprattutto su modelli sperimentali, gli studi che documentano effetti sull’uomo sono insufficienti per accertare una correlazione tra esposizione e alterazione della funzione tiroidea, sia per ciò che riguarda esposizioni professionali sia per esposizioni della popolazione generale. Risulta, inoltre, completamente inesplorata la possibile amplificazione degli effetti sulla salute dell’esposizione a distruttori endocrini in associazione ad altri fattori di rischio, quali ad esempio la carenza iodica ambientale, condizione che caratterizza tutto il territorio nazionale. Pertanto è fortemente sentita l’esigenza di aumentare le conoscenze per valutare l’impatto sulla salute umana di composti di sintesi potenzialmente tireostatici al fine di attuare adeguati interventi di prevenzione. A tal scopo è stato attivato un progetto mirato alla identificazione e valutazione degli effetti sulla omeostasi tiroidea dell’esposizione a xenobiotici, quali fitofarmaci (etilenbisditiocarbamati, benzimidazolici) e composti industriali (policlorobifenili, ritardanti di fiamma polibromurati).

Risultati attesi nel triennio

Il progetto prevede un approccio interdisciplinare in grado di integrare informazioni derivanti da indagini epidemiologiche, mirate ad accertare il rapporto di causa-effetto tra esposizioni professionali e/o ambientali e patologia tiroidea, e dall’utilizzo di modelli sperimentali volti all’approfondimento dei meccanismi patogenetici alla base degli effetti sulla tiroide e sul SNC derivanti dall’esposizione a tali sostanze.

In particolare, verranno studiati soggetti professionalmente esposti e soggetti della popolazione generale sui quali verranno valutati marcatori di esposizione in relazione ai marcatori di effetto e possibili marcatori di suscettibilità. Verranno inoltre utilizzati modelli sperimentali *in vivo* per la valutazione degli effetti sul SNC dell’esposizione in diversi stadi dello sviluppo, nonché modelli *in vitro* per lo studio dei meccanismi d’azione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio contribuiranno ad una migliore definizione del reale impatto sulla salute umana dell’esposizione a sostanze chimiche di sintesi rilasciate nell’ambiente attraverso l’impiego di pesticidi o come risultato dell’attività industriale. In particolare, l’acquisizione della base conoscitiva relativa al ruolo dell’esposizione a Interferenti Endocrini nell’eziologia delle patologie tiroidee consentirà di sviluppare un sistema di sorveglianza che potrà favorire l’attuazione di azioni di prevenzione per patologie altamente prevalenti nella popolazione generale.

Alterazioni funzionali e molecolari del recettore GABAB in modelli genetici di epilessia con assenze

Le epilessie primarie generalizzate sono caratterizzate da una componente genetica maggiore e si verificano approssimativamente nello 0.2% della popolazione al di sotto dei 25 anni. La caratteristica clinica comune è un breve periodo di perdita di contatto con la realtà esterna (crisi di assenza) mentre la controparte elettroencefalografica di un episodio ictale è la presenza delle cosiddette scariche punta-onda (SW, *spike and wave*). Evidenze ottenute da studi su pazienti affetti da epilessia con assenze e da animali normali resi epilettici mediante trattamento con convulsivanti, indicano che la neocorteccia svolge un ruolo chiave nella generazione delle scariche punta-onda. Tale ruolo primario è stato confermato nei ratti epilettici Wistar Albino

Glaxo/Rijswijk (WAG/Rij). Questi animali, come i pazienti affetti da epilessia con assenze, sono geneticamente predisposti alla comparsa di scariche punta-onda e pertanto rappresentano un modello animale estremamente utile per la comprensione dei meccanismi patogenetici alla base della malattia umana.

Il GABA è il neurotrasmettitore inibitorio più diffuso nel SNC dove, attraverso i recettori GABAA e GABAB, media rispettivamente una trasmissione inibitoria rapida e una lenta. Nonostante il chiaro coinvolgimento della trasmissione sinaptica GABAergica nelle epilessie, le alterazioni funzionali e le proprietà molecolari del recettore GABAB in modelli genetici di epilessia con assenze restano tuttora inesplorate.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è di identificare i meccanismi alla base delle scariche punta-onda nelle epilessie primarie generalizzate, utilizzando come modello i ratti WAG/Rij e focalizzando la nostra attenzione sul recettore GABAB. La nostra ipotesi è che nei ratti epilettici WAG/Rij la funzionalità dei recettori GABAB sia ridotta e sia associata ad una variazione dell'espressione delle sue subunità. I livelli di espressione delle differenti subunità del recettore GABAB verranno analizzati mediante *Real-Time* PCR e la loro distribuzione nella neocorteccia dei ratti WAG/Rij mediante microscopia confocale. Per valutare eventuali alterazioni della risposta GABAB-mediata, verranno effettuate registrazioni intracellulari in neuroni degli strati profondi della corteccia e in particolare verranno valutati i valori di *paire-pulse depression*, un fenomeno presinaptico, in sinapsi eccitatorie e inibitorie farmacologicamente isolate.

Trasferibilità dei risultati

La nostra conoscenza sulle epilessie primarie generalizzate è notevolmente avanzata negli ultimi decenni. Tuttavia, non è ancora noto come e perché il *network* talamocorticale diventi ipereccitabile e come si producano le scariche punta-onda nei pazienti affetti da epilessia. L'individuazione dei meccanismi responsabili della ipereccitabilità neocorticale e della generazione delle SW, potrebbe chiarire importanti aspetti patogenetici individuando nuovi possibili trattamenti farmacologici.

Alterazioni nell'ambiente gravitazionale e risposta neurocomportamentale nel topo

La ricerca intende studiare gli effetti della gravità sullo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico e del comportamento in un modello murino di riferimento. Il topo, infatti, per le sue ridotte dimensioni rappresenta una specie di vertebrato mammifero particolarmente indicata per le missioni spaziali. In particolare, si intende mettere a punto e validare protocolli sperimentali potenzialmente trasferibili a bordo della Stazione Spaziale Internazionale, in grado di identificare alterazioni in parametri neurochimici, morfologici e comportamentali quali effetto dell'esposizione perinatale a un ambiente gravitazionale alterato (2g, negli studi a terra). La valutazione degli effetti di breve, medio e lungo termine di tali esposizioni sullo sviluppo neurocomportamentale potrebbe infatti rilevare alterazioni sottili ma biologicamente di rilievo e individuare finestre temporali di sensibilità a tali ambiente durante i periodi critici dello sviluppo. La valutazione degli effetti riguarderà in particolare i) modificazioni nell'espressione di fattori di crescita polipeptidici e loro recettori nel SNC e periferico; ii) modificazioni nella morfologia di alcune aree cerebrali, con particolare attenzione alle quelle che sottostanno a processi cognitivi; iii) valutazione immunostochimica e biochimica di enzimi coinvolti nei processi di invecchiamento cerebrale; iv) effetti di breve, medio e lungo termine sullo sviluppo neurocomportamentale.

Risultati attesi nel triennio

Approfondimento delle conoscenze di quei fenomeni che sono alla base dello sviluppo del sistema nervoso e della sua plasticità per la prevenzione e il trattamento di varie sindromi degenerative neurologiche e mentali.

Approfondimento delle conoscenze dei fenomeni neurobiologici implicati nella *motion sickness* (nausea indotta dal movimento).

Identificazione dei rischi potenziali associati con la riproduzione e lo sviluppo in alterata gravità: valutazione del rischio da esposizione durante lo sviluppo (in utero e/o durante fasi precoci dell'ontogenesi postnatale) all'ambiente di iper- o micro-gravità.

Valutazione morfometrica e biochimica sugli effetti gravitazionali su specifiche aree cerebrali coinvolte in processi cognitivi.

Trasferibilità dei risultati

Messa a punto di modelli animali di riferimento in mammiferi altriciali per i processi ontogenetici di organizzazione e strutturazione dei repertori comportamentali, con particolare relazione all'interazione di fattori endogeni e fattori ambientali.

Messa a punto di un protocollo sperimentale con la descrizione del danno neurologico associato alla sindrome comportamentale.

Pubblicazioni scientifiche e partecipazione a convegni.

Animali transgenici nella malattia di Alzheimer: un nuovo modello

Obiettivo del progetto è la generazione di un nuovo modello animale della malattia di Alzheimer. In particolare, verranno realizzati dei topi transgenici in cui si possa indurre la morte dei neuroni colinergici specificamente nel telencefalo basale e in maniera controllata nel tempo. L'ipotesi alla base di tale modello sperimentale prevede che la over-espressione della proteina p49, appartenente alla famiglia del fattore di trascrizione NFkB, sia in grado di ridurre la attività della acetilcolintransferasi (ChAT) con conseguente riduzione della trasmissione sinaptica colinergica. Studi effettuati sulle cellule PC12, dimostrano che la proteina p49 è in grado di legarsi ad un sito all'interno del promotore dell'enzima ChAT riconosciuto anche da fattori di trascrizione attivati dal *Nerve Growth Factor* (NGF), scalandone il legame e provocando la riduzione della trascrizione dell'enzima. La proteina p49 può dunque essere un regolatore negativo della attività della ChAT.

Gli animali transgenici con un'espressione tessuto-specifica e inducibile verranno generati mediante l'utilizzo del *Tetracycline-Regulate System*. Questo sistema prevede la generazione di due linee di animali transgenici che verranno incrociate per ottenere una linea bigenica in cui si avrà l'espressione tessuto-specifica e inducibile, mediante somministrazione di doxycycline nell'acqua da bere, del gene desiderato.

Risultati attesi nel triennio

Gli animali transgenici esprimenti in maniera tessuto-specifica e inducibile la proteina p49, dovrebbero presentare le caratteristiche tipiche della malattia di Alzheimer quali: riduzione dell'attività della ChAT nei neuroni colinergici del telencefalo basale, depositi extracellulari di beta-amiloide nella corteccia e nell'ippocampo, iperfosforilazione della proteina tau nei neuroni corticali e ippocampali, perdita di neuroni nella corteccia e nell'ippocampo. Tali caratteristiche verranno individuate mediante metodologie biochimiche, molecolari, elettrofisiologiche e di *neuroimaging*. La comparsa di tali marcatori dovrebbe inoltre essere associata ad una riduzione della plasticità neuronale nell'ippocampo, analizzata mediante tecniche elettrofisiologiche.

Trasferibilità dei risultati

I topi transgenici p49 rappresentano un modello sperimentale alternativo della malattia di Alzheimer e consentiranno lo studio della relazione causale tra la disfunzione sinaptica

colinergica e la cascata di eventi patologici caratteristici della malattia; consentiranno inoltre lo studio del ruolo di NFkB nella degenerazione neuronale. Il chiarimento della cascata di eventi alla base dell'insorgenza della malattia di Alzheimer permetterà di individuare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci.

Basi molecolari della sindrome di Noonan e di malattie dello sviluppo correlate

La sindrome di Noonan (SN) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da cardiopatia congenita accompagnata da facies dismorfica, bassa statura, disturbi comportamentali e dell'apprendimento e difetti scheletrici e ematologici. La SN ha un'incidenza di 1:1000-1:2500 nati ed è una delle più frequenti condizioni sindromiche associate a difetti cardiaci congeniti. È stato dimostrato che mutazioni in PTPN11, il gene codificante la proteina tirosina fosfatasi SHP-2, sono la causa molecolare di questa malattia in circa il 50% dei soggetti affetti. Le mutazioni ad oggi identificate sono prevalentemente di tipo missenso e promuovono un guadagno di funzione della fosfatasi destabilizzandone la conformazione cataliticamente inattiva. Recentemente, mutazioni germinali nello stesso gene sono state identificate in alcune malattie genetiche in parte clinicamente sovrapponibili alla SN. Mutazioni somatiche del gene si riscontrano inoltre, con diversa prevalenza, in diverse forme leucemiche e tumori solidi.

Gli obiettivi principali di questo progetto sono: 1) l'analisi della prevalenza, distribuzione e spettro di mutazione del gene PTPN11 e lo studio della relazione genotipo/fenotipo; 2) la caratterizzazione funzionale delle mutazioni che interessano diversi domini della proteina e la comprensione del loro ruolo nella deregolazione delle vie di trasduzione del segnale mediate da SHP-2; 3) l'identificazione di nuovi geni responsabili della SN e di disordini dello sviluppo ad essa correlati.

Risultati attesi nel triennio

Le linee di ricerca proposte potranno delineare il diverso spettro fenotipico associato alle mutazioni di PTPN11, il tipo e la localizzazione delle mutazioni nel gene, la possibile associazione tra mutazioni e peculiari anomalie dello sviluppo. Lo studio inoltre cercherà di comprendere gli effetti delle mutazioni sulla funzione della proteina e fornirà dati che consentiranno di identificare nuovi geni-malattia responsabili di queste patologie.

Trasferibilità dei risultati

La comprensione delle basi molecolari della SN e delle malattie genetiche ad essa correlate è fondamentale per definire in modo appropriato un percorso diagnostico e terapeutico di queste condizioni patologiche. I risultati prodotti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Basi molecolari e biobanca 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 realizzare un archivio biologico (banca del DNA) riferito alla popolazione di soggetti affetti da IC su territorio nazionale. Tale biobanca rappresenta la naturale evoluzione e completamento della banca dati afferente al Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di nuovi geni-malattia per l'IC primario.

Realizzazione della banca biologica per l'IC, tramite il campionamento dei casi già arruolati nel Registro Nazionale degli Ipotiroidei 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.

Basi molecolari e cellulari delle complicanze microvascolari diabetiche: meccanismi patogenetici legati al metabolismo del glucosio in eccesso

Il danno vascolare nel diabete è caratterizzato da un alterato rimodellamento tissutale, legato ad una modificazione di diversi mediatori. Questo meccanismo sembra innescato dall'iperglicemia e dalle alterazioni biochimiche associate, tra cui l'attivazione della via dei polioli, la glicazione non enzimatica, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno. Il distretto vascolare risulta colpito a livello dei grossi vasi (macroangiopatia), che del piccolo circolo, (microangiopatia) tra cui rene, retina e nervi. La lesione centrale è costituita dalla disfunzione endoteliale, in grado di innescare tutte le alterazioni vascolari tipiche della vasculopatia diabetica, ma anche di altre vasculopatie su base sclerotica.

Le alterazioni della barriera vascolare sono le più precoci e si manifestano sia clinicamente, ad esempio con la proteinuria,, che sperimentalmente mediante l'incremento della deposizione di macromolecole nella parete vascolare. Questo progetto di ricerca si propone di esaminare i possibili meccanismi patogenetici, legati al metabolismo del glucosio in eccesso, responsabili della disfunzione vascolare diabetica e aterosclerotica, mediante modelli sperimentali *in vitro* costituiti da sistemi cellulari o tissutali, e modelli in vivo, costituiti da animali resi sperimentalmente diabetici, con particolare riferimento ai processi aterogeni di natura ossidativa e ai fattori emodinamici.

Risultati attesi nel triennio

I risultati di questa linea di ricerca potrebbero: 1) contribuire alla comprensione dei meccanismi che sono alla base della vasculopatia aterosclerotica e del ruolo dell'eccesso di glucosio in tali eventi; 2) indicare potenziali interventi basati sulla manipolazione di queste vie metaboliche, consentendo da un lato un efficace intervento sui fattori metabolici di effettivo rilievo patogenetico, dall'altro l'individuazione dei soggetti a rischio, cioè di quella parte di pazienti diabetici in cui le complicanze tardive si manifestano in forma clinicamente rilevante come risultato dell'effetto combinato dello squilibrio metabolico e di una predisposizione, su base genetica e/o ambientale

Trasferibilità dei risultati

Gli studi dedicati alla comprensione dei meccanismi patogenetici della vasculopatia diabetica hanno lo scopo di aprire nuove strade per la prevenzione e il trattamento di complicanze invalidanti per il paziente, che costituiscono una delle principali cause di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati. L'aumento della prevalenza di diabete e dell'aspettativa di vita per essi ha portato, inoltre, ad un aumento di pazienti a rischio di sviluppare complicanze vascolari, che, unitamente ai soggetti già complicati, costituisce un notevole onere per il sistema socio-sanitario

BSE transmission through food and blood products: a study in primates to assess the risk for humans

È stato calcolato che oltre 400000 bovini infetti da BSE siano entrati nella catena alimentare umana prima dell'obbligo di rimozione del sistema nervoso centrale nel 1989. L'esposizione alla BSE è proseguita anche dopo l'introduzione di questo divieto attraverso l'uso di carne recuperata meccanicamente dalla colonna vertebrale, vietata poi nel 1995. Nonostante la curva epidemica della variante di MCJ (vMCJ) appaia in fase discendente, il livello di attenzione deve restare alto perché l'impossibilità di diagnosticare queste malattie durante il lungo tempo di incubazione rende estremamente difficile valutare la prevalenza dell'infezione. La recente scoperta della BSE in USA e Canada dove il consumo di cervello e altri visceri è andato avanti sino al 2003 e la scoperta di episodi di trasmissione di vMCJ dovuti probabilmente a trasfusioni di sangue da donatori infetti sottolinea la necessità di comprendere meglio qual'è il rischio di contrarre la vMCJ attraverso il consumo di prodotti di origine bovina. Per fornire delle informazioni utili per le scelte di sanità pubblica in questo settore, abbiamo preso parte ad un consorzio europeo che sta effettuando studi su un modello sperimentale di primati non umani infettati per via orale con l'agente della BSE allo scopo di valutare la dose minima infettante per la BSE nei primati.

Risultati attesi nel triennio

Determinare la dose orale infettante minima per la BSE nei primati.

Determinare se il sangue di questi animali è infetto.

Nel caso in cui il sangue sia infetto, determinare se il livello di infettività cambia a seconda dello stadio dell'infezione e con quale frazione del sangue sia associato.

Definire il coinvolgimento del sistema linforeticolare nella patogenesi dell'infezione.

Creare una banca di tessuti degli animali infetti per l'identificazione di *marker* di infettività.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio avranno evidenti vantaggi in ambito di sanità pubblica umana e animale. La comprensione dei meccanismi di diffusione dell'infezione nell'organismo potrà contribuire alla messa a punto di test diagnostici precoci e consentirà anche di definire il periodo dell'infezione durante il quale è più proficuo avviare un intervento terapeutico.

Gli studi di infettività sul sangue forniranno preziose informazioni per valutare la sicurezza di sangue e emoderivati e per adottare opportune misure per ridurre i possibili rischi.

Caratterizzazione funzionale della proteina MCL1 implicata nella leucoencefalopatia megalencefalica con cisti subcorticali

Mutazioni nel gene codificante per MLC1 sono state associate ad una rara forma ereditaria di leucodistrofia spongiforme ad esordio infantile, denominata leucoencefalopatia megalencefalica con cisti subcorticali. Questa malattia è caratterizzata da alterazioni della mielina ed estesa neurodegenerazione con un progressivo deterioramento delle funzioni motorie, atassia, spasticità, crisi epilettiche e declino delle facoltà mentali. Ad oggi, il ruolo di MLC1 non è noto

e non esiste una terapia per curare la leucoencefalopatia megalencefalica. La strategia che verrà adottata per studiare la funzione di MLC1 consiste in un approccio combinato, in modelli sperimentali *in vitro*, che si avvale di tecniche di biologia molecolare, biochimica, elettrofisiologia e proteomica. Attraverso questo approccio, cercheremo di comprendere la specifica funzione di MLC1 e di studiarne le interazioni con altre proteine cellulari. Una volta chiarito il ruolo fisiologico di MLC1 e identificato un saggio per valutarne l'attività funzionale, cercheremo di capire in che modo mutazioni nel gene MLC1, riscontrabili in pazienti affetti da leucoencefalopatia megalencefalica, influenzino la funzione della proteina da esso codificata.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto ha come obiettivo ultimo l'acquisizione di conoscenze sulla funzione della proteina MLC1, espressa nel sistema nervoso centrale, e sul suo coinvolgimento nelle alterazioni neuropatologiche e funzionali associate con la leucoencefalopatia megalencefalica. I risultati attesi sono: 1) la caratterizzazione biochimica e funzionale della proteina MLC1; 2) l'identificazione di proteine che interagiscono con MLC1; e 3) l'analisi biochimica e funzionale della proteina MLC1 mutata.

Trasferibilità dei risultati

Una migliore comprensione della funzione della proteina MLC1 nella fisiologia cerebrale e del suo ruolo nella patogenesi della leucoencefalopatia megalencefalica potrebbe fornire informazioni importanti per lo sviluppo di una terapia più efficace per curare i bambini affetti da MLC. In questa prospettiva, l'identificazione di molecole che interagiscono con la proteina MLC1 potrebbe rivelare nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici per questa rara malattia genetica.

Caratterizzazione neurocomportamentale di modelli murini transgenici di sindromi di ritardo mentale

Il progetto, che rientra nell'ambito dei progetti di collaborazione scientifica tra l'ISS e il *National Institute of Health* è realizzato in collaborazione con la prof.ssa Jacqueline Crawley, responsabile del Laboratorio di *Behavioral Neuroscience*, al *National Institute of Mental Health*.

Lo sviluppo della genetica molecolare ha incrementato la conoscenza delle basi biologiche di sindromi di ritardo mentale a base genetica/cromosomica, rendendo disponibili animali transgenici in cui è possibile studiare *in vivo* gli effetti delle stesse alterazioni genetiche riscontrate in sindromi di ritardo mentale umane (e.g. sindrome di Down, sindrome dell'X-fragile, sindrome di Rett). Accanto allo studio dei meccanismi patogenetici, questi modelli animali hanno anche consentito lo studio del fenotipo comportamentale della mutazione nella specie murina. La maggior parte degli studi comportamentali svolti finora su tali modelli si è tuttavia focalizzata sull'animale adulto. Il presente progetto si focalizza invece sullo studio comportamentale delle fasi precoci dello sviluppo postnatale. L'attività di ricerca consiste nella caratterizzazione del fenotipo comportamentale precoce (ovvero durante le prime settimane di vita postnatale), con particolare attenzione agli aspetti relativi alle competenze cognitive e sociali, in modelli animali di sindromi di ritardo mentale, quali *Mecp2* (sindrome di Rett), *Alfagdi* (ritardo mentale non specifico associato al cromosoma X umano) e altri modelli di sindromi di ritardo mentale.

Risultati attesi nel triennio

Primo obiettivo del progetto è una dettagliata caratterizzazione comportamentale durante le prime fasi dello sviluppo postnatale di modelli animali di ritardo anche mediante lo sviluppo e la messa a punto di nuovi protocolli sperimentali per lo studio delle capacità di discriminazione olfattiva neonatale utilizzando diversi tipi di odori sociali. Verranno quindi valutate nelle linee genetiche selezionate: i) le vocalizzazioni ultrasoniche neonatali e la modulazione

dell'emissione ultrasonica da parte degli stimoli olfattivi e tattili forniti dalla madre e dai fratelli all'interno della nidiata di appartenenza (fenomeno di potenziamento materno dell'emissione ultrasonica); ii) capacità di discriminazione olfattiva di stimoli di natura sociale (odore del nido/odore di un maschio adulto non familiare) e non sociale, capacità di apprendimento e memoria di una risposta di evitamento passivo; iii) livelli di motivazione sociale e analisi qualitativa dell'interazione sociale [un *test* di misurazione dell'interesse sociale (*sociability test*) è stato recentemente messo a punto nel laboratorio del *partner* NIH].

Secondo obiettivo del progetto è invece lo sviluppo e la standardizzazione di strategie sperimentali e metodologie mirate sia all'aumento della affidabilità del dato comportamentale per se, che e al miglioramento del benessere degli animali transgenici.

Trasferibilità dei risultati

Validazione dei modelli animali di ritardo mentale oggetto dello studio, soprattutto per l'aspetto concernente il profilo temporale dell'insorgenza delle prime evidenze cliniche del disturbo cognitivo.

Identificazione di marcatori comportamentali neonatali da utilizzare negli studi degli effetti di terapie riabilitative e/o farmacologiche precoci.

Inoltre i risultati dell'attività sperimentale verranno disseminati mediante pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, e partecipazione a Congressi nazionali e internazionali. Si prevede l'organizzazione di un convegno internazionale presso l'ISS in cui verranno presentati i dati raccolti nell'ambito di questo e altri progetti collaborativi ISS-NIH di argomento affine, afferenti al Reparto di Neuroscienze comportamentali.

Cellule staminali neurali come fonte di cellule mielinogeniche per la terapia cellulare delle malattie demielinizzanti

La sclerosi multipla (SM) consiste in un processo infiammatorio che colpisce aree circoscritte della sostanza bianca del sistema nervoso centrale e provoca la distruzione della mielina e delle cellule specializzate, gli oligodendrociti, che la producono. La rimielinizzazione è il processo attraverso il quale nuovi strati di mielina si formano intorno alle fibre nervose demielinizzate e ne ripristinano la capacità di trasmettere l'impulso nervoso. Questo processo riparativo è tuttavia scarso nel sistema nervoso centrale e, nei pazienti con SM, appare limitato alle fasi iniziali della malattia. Le evidenze disponibili indicano che la rimielinizzazione è sostenuta da precursori degli oligodendrociti presenti nelle lesioni della SM e che l'infiammazione è indispensabile per stimolare la produzione di fattori che favoriscono il reclutamento e il differenziamento di tali precursori. Questo progetto si propone di acquisire nuove conoscenze sui processi riparativi della mielina attraverso studi condotti in modelli cellulari che analizzano i segnali implicati nella motilità, nella crescita e nella maturazione di precursori degli oligodendrociti in condizioni che mimano, almeno in parte, l'ambiente infiammatorio delle lesioni demielinizzate della SM.

Risultati attesi nel triennio

Questa ricerca ha come obiettivo generale l'acquisizione di nuove conoscenze sui meccanismi molecolari che sottendono ai processi di rimielinizzazione in corso di infiammazione. Gli obiettivi specifici sono: 1) identificazione e caratterizzazione funzionale dei recettori e delle interazioni tra diverse classi di recettori (per es. recettori purinergici, citochinici e chemiochinici) la cui attivazione è implicata nella regolazione della migrazione dei progenitori degli oligodendrociti; 2) studio degli effetti di prodotti dell'infiammazione, quali la citochina *tumor necrosis factor* (TNF), sulla proliferazione e differenziamento dei progenitori degli oligodendrociti; 3) valutazione degli effetti pro-rimielinizzanti di nuove molecole attive sui recettori del TNF.

Trasferibilità dei risultati

Una migliore comprensione dei meccanismi che promuovono i processi di migrazione, espansione e maturazione degli oligodendrociti può fornire indicazioni importanti per lo sviluppo di terapie che favoriscano la rimielinizzazione e possano essere impiegate, in associazione con farmaci immunomodulatori e immunosoppressivi, per la cura dei pazienti affetti da malattie infiammatorie demielinizzanti del sistema nervoso centrale, quali la sclerosi multipla.

CSF based tests in neurodegenerative diseases

Il progressivo innalzamento dell'aspettativa di vita nella popolazione europea rende sempre più urgente approfondire la conoscenza delle cosiddette malattie dell'invecchiamento a cui appartengono le patologie neurodegenerative.

Di particolare importanza è la diagnosi differenziale di queste malattie che, nelle fasi precoci, possono presentarsi con quadri clinici di non facile interpretazione. Una diagnosi corretta assume una rilevanza primaria per poter intraprendere trattamenti sintomatici e neuroprotettivi.

Un contributo alla formulazione di una corretta diagnosi può derivare naturalmente dallo sviluppo di nuovi *test* neurofisiologici e di laboratorio. In questo senso è possibile intervenire sia per migliorare i *test* esistenti che per identificare nuovi marcatori di malattia. I nuovi marcatori di malattia devono assicurare sensibilità e specificità al *test* che deve pure risultare affidabile e deve essere applicabile a tessuti accessibili come ad esempio il sangue, ma anche il liquido cefalorachidiano.

Per cercare di fornire alcune soluzioni a questi problemi abbiamo preso parte ad un consorzio europeo che ha presentato un progetto al sesto programma quadro dell'Unione europea.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di proteine o altre molecole coinvolte in meccanismi specifici di malattia.

Identificazione di alterazioni post-traduzionali specifiche (glicosilazione o fosforilazione) o di stati di aggregazione patologici.

Definizione dei *pattern* di espressione genica alterati in tessuti periferici che possano chiarire alcuni meccanismi patogenetici e che possano fornire indicazioni su nuovi potenziali marcatori di malattia.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto è stato stilato in risposta ad un bando europeo che aveva come obiettivo lo sviluppo di metodi efficaci per la diagnosi delle malattie neurodegenerative. I risultati che ci aspettiamo di ottenere potranno permettere di sviluppare dei *test* diagnostici da applicare al sangue e al liquido cefalorachidiano.

Questo permetterà di attivare interventi terapeutici precoci e mirati con chiari benefici per il paziente, i parenti e il sistema sanitario nel suo complesso.

La disponibilità di nuovi metodi diagnostici potrebbe inoltre consentire di attivare una produzione e uno sfruttamento su scala industriale di questi *test*.

Danno neurotossico da beta amiloide e da aminoacidi eccitatori: interazione cellule gliali/neuroni e fattori neuroprotettivi

Scopo del progetto è lo studio del ruolo delle cellule gliali in alcuni meccanismi di tipo neurodegenerativo, quali la tossicità della beta amiloide e la eccitossicità. Il progetto ha lo scopo di utilizzare modelli cellulari adeguati, quali colture primarie neuronali e gliali di ippocampo,

corteccia e retina di ratto, per contribuire a chiarire alcuni quesiti relativi alla patogenesi del danno e per identificare possibili fattori di neuroprotezione. Saranno affrontati i seguenti punti:

- Interazione beta amiloide-microglia.

Abbiamo recentemente mostrato che bloccando il canale del cloro CLIC 1 si ottiene un'inibizione dello sviluppo di un fenotipo microgliale neurotossico. Scopo del presente progetto sarà esplorare la modulazione della funzionalità microgliale, con particolare attenzione alle capacità fagocitiche.

- Identificazione di meccanismi protettivi.

Alcuni prodotti di origine naturale, come l'estratto della Curcuma longa, hanno mostrato azione protettiva nei meccanismi neurotossici; in particolare, abbiamo recentemente mostrato un effetto neuroprotettivo su colture primarie di retina verso l'iperstimolazione del recettore del glutammato. Tale studio proseguirà con gli obiettivi di 1) caratterizzare i meccanismi cellulari di tale neuroprotezione; 2) verificare se tale protezione è attiva in altri meccanismi neurotossici (ad esempio, nella tossicità da beta amiloide; 3) studiare il ruolo delle cellule gliali nella protezione.

Risultati attesi nel triennio

Nella malattia di Alzheimer, la microglia, pur mostrando alla periferia della placca amiloide un fenotipo attivato, sembra incapace di esplicare la sua normale funzione fagocitica; al contrario, in contatto con la beta amiloide, produce sostanze potenzialmente neurotossiche, come il TNFalfa e l'ossido nitrico. Abbiamo osservato che il blocco del canale del cloro CLIC1 sopprime l'aumento di specie potenzialmente neurotossiche da parte della microglia trattata con beta amiloide. Lo studio in corso chiarirà se il blocco del canale del cloro modifica e in che modo l'attività fagocitaria della microglia.

Trasferibilità dei risultati

Sopprimere la produzione di fattori neurotossici indotti dal contatto con la beta amiloide nella microglia, senza alterarne (o magari stimolandone) la fagocitosi, potrebbe essere un obiettivo da inserire proficuamente in una strategia terapeutica della malattia di Alzheimer.

La caratterizzazione *in vitro* dell'attività neuroprotettiva di farmaci naturali può proficuamente precedere la sperimentazione *in vivo*, permettendo di selezionare le sostanze di maggiore interesse.

Differenziamento e attivazione di cellule dendritiche per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici

Questo progetto si inserisce nel *Network* di Eccellenza (NoE) Europeo "DC-THERA-Dendritic cells for Novel immunotherapies", finanziato nell'ambito del 6th Programma Quadro su *Life Science, Genomics and Biotechnology for Health*. Il NoE DC-THERA ha lo scopo di integrare le attività di 26 gruppi di ricerca di base e clinica, e 6 piccole/medie imprese di alta qualità europee. L'ambizioso obiettivo finale è il trasferimento di conoscenze di base sulla biologia delle cellule dendritiche (DC), ottenute con un approccio multidisciplinare (che include genomica, proteomica e bioinformatica, biologia molecolare e cellulare, e modelli animali pre-clinici) in protocolli clinici di immunoterapia del cancro e dell'infezione da HIV, basati sull'uso di DC. Il contributo specifico al NoE del gruppo della Dott.ssa Gessani riguarderà 1) lo studio di vie di trasduzione del segnale operanti in DC e 2) la manipolazione *in vitro* dell'attivazione delle DC, e verrà effettuato in diversi modelli di DC *in vitro* e *ex vivo*, rilevanti per la potenziale utilizzazione di DC in nuove immunoterapie per l'infezione da HIV.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi dagli studi afferenti al NoE riguarderanno 1) i meccanismi che controllano l'induzione e l'estinzione della produzione di fattori solubili (citochine e chemochine) nella risposta precoce all'HIV 2) i meccanismi responsabili dell'induzione di tolleranza in seguito ad

esposizione al virus HIV o ad alcuni sui componenti 3) la risposta migratoria delle DC attivate in condizioni sperimentali che favoriscono l'acquisizione di proprietà immunostimolatorie o, viceversa, tollerogeniche 4) la definizione delle modalità di attivazione delle DC in seguito a stimolazione di recettori di superficie e/o all'interazione con altre componenti del sistema immunitario (es. cellule T gamma/delta). Questi studi verranno effettuati in parallelo su DC del comparto mieloide (generate *in vitro* da monociti o isolate dal sangue periferico) e plasmacitoide.

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 trasferiti in modelli pre-clinici per il trattamento dell'infezione di HIV, in cui verrà effettuato uno studio globale della risposta immunitaria. Inoltre la definizione delle caratteristiche funzionali distintive di diverse popolazioni di cellule dendritiche, sarà importante per la scelta della(e) sottopopolazione(i) di DC più idonea allo sviluppo di immunoterapie innovative e efficaci.

Dosaggio dei marcatori dello stress ossidativo per la diagnosi e la prevenzione del danno ipossico-ischemico neonatale

L'ipossia perinatale è la principale causa di danno cerebrale del neonato e non sono ad oggi disponibili alla clinica marcatori diagnostici e prognostici del danno neurologico. Tra le cause di danno cerebrale conseguente ad eventi ipossici-ischemici o infiammatori durante il periodo fetale e perinatale emerge la corioamnionite, caratterizzata da infiammazione placentare e parto pretermine.

Ricerche condotte nell'ambito di un progetto precedentemente finanziato (Ricerca Finalizzata 2000; scadenza 12/04) hanno dimostrato che in un modello animale di ipossia perinatale i livelli cerebrali di isoprostani, *marker* del danno ossidativo in vivo e in vitro, sono elevati e correlati ai disturbi neurologici presentati da questi animali. Questi dati hanno incoraggiato una prosecuzione e un approfondimento della ricerca in ambito clinico. In collaborazione con il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova è stato effettuato uno studio pilota sul sangue cordonale di 80 neonati sani.

Ci proponiamo di utilizzare questi *marker* - analizzandone i livelli sia nel siero da cordone ombelicale che nel liquido amniotico e nel tessuto placentare - come strumento non invasivo per migliorare la comprensione dei meccanismi coinvolti nel danno cerebrale in seguito ad eventi ipossici-ischemici o infiammatori durante il periodo fetale e perinatale.

Risultati attesi nel triennio

Rendere disponibile uno strumento non invasivo per migliorare la comprensione dei meccanismi coinvolti nel danno cerebrale in seguito ad eventi ipossici-ischemici o infiammatori durante il periodo fetale e perinatale, e eventualmente suggerire possibili strategie terapeutiche di prevenzione degli esiti neurologici.

I valori di isoprostani nel sangue cordonale saranno correlati con parametri clinici e strumentali valutati dal Dr. Zanardo e dalla Dr.ssa Suppei del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova. In particolare verrà effettuata un'analisi istologica della placenta e saranno quantificati i potenziali evocati dei neonati.

Verrà sviluppata una metodica analitica per la quantificazione degli isoprostani in altre matrici biologiche quali tessuto placentare e liquido amniotico.

Trasferibilità dei risultati

Il dosaggio degli isoprostani potrà essere inserito tra le analisi cliniche e costituire un indice predittivo degli esiti neurologici.

Consentirà di disporre di un indice precoce di danno e identificare i neonati ad alto rischio di disabilità per i quali adottare tempestivamente terapie neuroprotettive

Eccitotossicità glutamatergica e ruolo degli amminoacidi ramificati nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

Nel progetto sarà studiato se, e attraverso quale meccanismo, un eccesso di amminoacidi ramificati (AAR) possa aggravare il danno eccitotossico. Saranno affrontati i seguenti punti: 1) Studio della vulnerabilità dei neuroni corticali e dei motoneuroni spinali al danno eccitotossico in presenza di ARR. Saranno utilizzate colture primarie di corteccia e ippocampo di ratto e di topi transgenici che sovraesprimono SOD1 umana non mutata o la SOD1 umana mutata alla posizione 93. Il danno eccitotossico sarà realizzato con la stimolazione dei recettori del glutammato. 2) Ruolo delle cellule astrocitarie nel danno eccitotossico in presenza di eccesso di AAR. Sarà studiata l'influenza degli AAR sulla funzionalità dei trasportatori astrocitari del glutammato. 3) Studio del *pathway* AAR/glutammato/glutammina. Gli AAR forniscono azoto per la sintesi di glutammato e glutammina attraverso una reazione di transaminazione, catalizzata da due diverse isoforme di una aminotransferasi, una mitocondriale (BCATm), espressa dai neuroni e dagli oligodendrociti, e una citosolica (BCATc), espressa da astrociti e microglia. Le due forme saranno caratterizzate nelle differenti popolazioni cellulari e nei vari modelli cellulari. 4) Studio della modulazione della trasduzione del segnale a livello sinaptico. Saranno caratterizzate le modificazioni post-traduzionali dei recettori per il glutammato e delle proteine coinvolte nella formazione dei complessi macromolecolari ad esso associati.

Risultati attesi nel triennio

Nella prima fase della ricerca (primo anno) verranno messe a punto le condizioni sperimentali per lo studio dei parametri sopraindicati nei modelli cellulari 1) colture di corteccia di ratto 2) colture di corteccia di topo *wild type* SOD1 e G93A; 3) colture di cellule astrocitarie; 4) co-colture neuronali/gliali; 5) motoneuroni spinali. In seguito sarà quindi possibile caratterizzare caratterizzarne gli effetti di AAR, in presenza o meno di aminoacidi eccitatori.

Criteri per la verifica dell'adeguata messa a punto dei vari tipi di colture saranno:

valutazione della sopravvivenza cellulare neuronale: saranno considerate soddisfacenti colture in cui l'apoptosi a DIV X non supera il 20%.

valutazione del differenziamento cellulare; saranno applicati tecniche di immunocitochimica per valutare l'espressione di marcatori del differenziamento cellulare neuronale e gliale.

I risultati dello studio contribuiranno a verificare: 1) l'ipotesi che gli aminoacidi ramificati, abitualmente assunti in dosi massicce dai calciatori come integratori alimentari, possano contribuire ad aumentare il rischio di SLA in questi soggetti; 2) se nel meccanismo patogenetico di tale tossicità gioca un ruolo fondamentale l'eccitotossicità; 3) quali tipi cellulari sono coinvolti; 4) quali meccanismi di trasduzione del segnale sono attivati.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto consentirà di approfondire la conoscenza degli effetti fisiologici e tossici dell'uso di sostanze che, anche se non espressamente vietate, sembrano essere assunte a dosi molto superiori a quelle raccomandate. Qualora i risultati dello studio dovessero confermare l'ipotesi di un ruolo favorente dell'assunzione di tali sostanze nella SLA, il progetto potrebbe avere anche ricadute importanti in termini di sanità pubblica e di controllo del *doping*.

ERA-NET for research programmes on rare diseases (E-Rare)

E-Rare è un progetto ERA-NET, finanziato dalla Commissione Europea, sulle malattie rare.

Il piano ERA-NET mira ad incoraggiare la creazione di collaborazioni strette e durature fra programmi nazionali di ricerca che condividono obiettivi comuni e contribuirà alla creazione dello spazio europeo della ricerca.

E-Rare ha l'obiettivo di coordinare i programmi di ricerca sulle malattie rare esistenti a livello di singoli Paesi e preparare attività strategiche congiunte per superare le limitazioni esistenti imposte dalla frammentazione delle attuali ricerche in questo settore.

Otto Paesi (Belgio, Francia, Germania, Israele, Italia, Olanda, Spagna, Turchia) intendono elaborare un piano d'azione comune per effettuare *calls for proposal* per la ricerca transnazionale, per favorire lo spostamento di ricercatori e medici.

Obiettivi del progetto sono: a) sviluppare sinergie fra i programmi di ricerca nazionali sulle malattie rare negli otto Paesi; b) stabilire una cooperazione efficace e duratura; c) coordinare azioni nazionali per superare la frammentazione della ricerca sulle malattie rare e promuovere approcci interdisciplinari. L'ISS, partecipare alle attività congiunte del progetto e coordina il WP2 i cui obiettivi sono: analisi dei programmi nazionali di ricerca a livello europeo e internazionale; organizzazione del primo *Meeting* per giungere alla realizzazione di attività strategiche congiunte.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione di *calls for proposal* transnazionali per progetti di ricerca sulle malattie rare; scambio di ricercatori da un Paese all'altro; scambio di medici da un Paese all'altro.

Elaborazione di *Report* intermedi e un *Report* finale da sottoporre alla Commissione Europea riguardante le linee guida di *good practice* da adottare per il finanziamento dei programmi di ricerca nelle malattie rare.

Trasferibilità dei risultati

Strategia per il coordinamento trans-nazionale della ricerca nei singoli Paesi, favorendo le sinergie e lo scambio di ricercatori e medici fra i Paesi.

Il prodotto finale di E-RARE sarà la elaborazione di un *Report* finale da sottoporre alla Commissione Europea riguardante le linee guida di *good practice* da adottare per il finanziamento dei programmi di ricerca nelle malattie rare e l'ISS ospiterà, a tale riguardo, il *workshop* iniziale durante il quale si porranno le basi per giungere alla realizzazione di attività strategiche congiunte.

E-Rare, in questo progetto ERA-NET, mira a rendere possibile nel prossimo futuro una collaborazione significativa, in termini di programmazione strategica e progettazione di programmi di ricerca comuni, di apertura reciproca dei programmi nazionali di ricerca a ricercatori di altri paesi membri, di organizzazione di inviti comuni a presentare proposte e del varo di programmi pienamente transnazionali, finanziati in comune.

Esocitosi glutammatergica e cross-talk eccitotossico tra motoneuroni e glia nella Sclerosi Laterale Amiotrofica: ricerca di nuovi *targets* farmacologici

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. Esistono due forme di SLA: una sporadica (SLAs) e una familiare (SLAf). Come per altre malattie neurodegenerative, anche nel caso della SLA, sono state ipotizzate varie eziologie tra cui fattori ambientali, autoimmunità, *stress* ossidativo, infezioni virali e alterazioni nell'omeostasi del glutammato. Il 15-20% dei casi di SLAf è dovuto a mutazioni puntiformi nel gene della SOD1, enzima che controlla la rimozione del radicale superossido. Queste mutazioni a carico della SOD1 determinerebbero l'acquisizione di una o più funzioni tossiche (*gain-of function*) a carico dell'enzima, piuttosto che una semplice diminuzione della capacità di *scavenging* dello ione

superossido. Tra le varie cause della SLA numerose evidenze indicano che una alterazione nell'omeostasi glutammatergica, con conseguente eccitotossicità e morte neuronale, abbia un ruolo fondamentale. Sebbene la SLA sia considerata il prototipo delle malattie del motoneurone, numerosi dati indicano che la patogenesi richieda un contributo attivo di altri tipi cellulari in un complesso *cross-talk* molecolare il cui esito finale è la morte del motoneurone stesso. In effetti, l'espressione selettiva della SOD1 mutata nei motoneuroni o negli astrociti non produce alcuna degenerazione del motoneurone o alcun significativo fenotipo neurologico, mentre il fenotipo SLA è riprodotto in modelli animali quando il gene della SOD1 mutata è espresso ovunque. È possibile che nella SLA sia presente un meccanismo *non-cell autonomous*, vale a dire cellule diverse dal neurone giocano un importante ruolo nella morte del motoneurone stesso.

Risultati attesi nel triennio

Per lo studio proposto saranno utilizzate colture primarie di motoneuroni e di cellule corticali, fettine di midollo spinale e di corteccia cerebrale ottenute da topi SOD1-G93A, da topi SOD1-WT (il modello di controllo che over-esprime la SOD1 umana non mutata) e topi di controllo. Gli obiettivi principali del progetto saranno :

lo studio dei meccanismi che controllano sia l'aumento dei livelli di Ca²⁺ intracellulare neuronale e astrocitario sia la liberazione di glutammato nella corteccia motoria e nel midollo spinale, in controlli e in modelli di malattia;

l'identificazione di possibili bersagli molecolari modificati dalle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto nella corteccia motoria e nel midollo spinale, in colture di motoneuroni o nella corteccia motoria in presenza o assenza di overespressione della SOD1 mutata. In particolare si cercherà di individuare: i) le eventuali modificazioni, indotte dallo *stress* ossidativo, a carico delle proteine coinvolte nel complesso di *docking/fusion* delle vescicole al terminale sinaptico; ii) i meccanismi molecolari attivati dagli ossidanti mediante l'analisi dell'attività di specifiche fosfotirosina fosfatasi e di tirosina chinasi della famiglia src coinvolte nella funzionalità recettoriale glutammatergica;

l'approfondimento delle conoscenze sul ruolo delle cellule gliali e della microglia nella patogenesi del danno selettivo dei motoneuroni in corso di SLA, in presenza o assenza di overespressione della SOD1 mutata;

lo studio *in vitro* e *in vivo* di fattori neuroprotettivi (composti SOD-mimetici; terapie combinate).

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti contribuiranno ad una migliore caratterizzazione del *pathway* glutammatergico in un modello murino di SLA. Questo studio potrà fornire indicazioni utili per nuove strategie terapeutiche legate alla iperattività glutammatergica e alla ipereccitabilità neuronale, fenomeni ampiamente descritti nella SLA. Inoltre, verranno approfonditi alcuni aspetti neurodegenerativi legati allo *stress* ossidativo e alla eccitotossicità, e valutata la possibile valenza terapeutica di molecole neuroprotettive. Diffusione dei dati raccolti alla comunità scientifica attraverso i consueti canali (congressi e pubblicazioni internazionali) e saranno resi noti anche attraverso incontri annuali di *progress report*.

EuOrphan

EuOrphan è progetto finanziato dalla commissione EU, in cui l'ISS partecipa in qualità di *partner*. L'obiettivo primario del progetto è la costruzione e validazione di un servizio per la distribuzione di un set completo di informazioni relativo ai farmaci designati "orfani" e/o commercializzati in Europa e nei Paesi non europei per il trattamento delle malattie rare. La diffusione di queste informazioni riguarderà tutti i *partner* coinvolti nello sviluppo dei farmaci (medici, pazienti, operatori di sanità pubblica, industrie farmaceutiche, ecc.).

Inoltre, il progetto intende essere anche uno strumento informativo a sostegno della legislazione europea sui prodotti medicinali orfani (Regolamento EU 141/2000), allo scopo di promuovere la ricerca e sviluppo di farmaci orfani per le malattie rare.

Quattro *services* Euorphan distinti sono accessibili mediante Internet, ciascuno è dedicato ad una specifica categoria: medici, istituzioni, associazioni dei pazienti, industrie farmaceutiche.

Un ruolo chiave è giocato dalle istituzioni pubbliche che partecipano al progetto sia fornendo dati sia mediante il loro supporto alla gestione del progetto. I dati contenuti nel database includono: caratteristica del prodotto, stadio di sviluppo, prezzo e rimborsabilità, *sponsor*, data di autorizzazione al commercio, codice ATC, designazione terapeutica e/o orfana.

Risultati attesi nel triennio

Costruzione e fruibilità di quattro distinti *services* Euorphan accessibili mediante Internet; ciascun *service* è dedicato ad una specifica categoria: medici, istituzioni, associazioni dei pazienti, industrie farmaceutiche.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di un servizio informativo su web sui prodotti medicinali orfani, accessibile a medici, istituzioni, associazioni dei pazienti, industrie farmaceutiche.

Eziopatogenesi dei disturbi neuropsichiatrici in età evolutiva: studio dei fattori di rischio genetici, epigenetici e socioambientali in modelli animali di riferimento

I disordini comportamentali e psichiatrici in età evolutiva rappresentano un problema di rilevante impatto sociosanitario. Per un ampio spettro di tali disturbi, caratterizzati da deficit comportamentali e cognitivi moderato/gravi (ritardo mentale, ADHD, autismo e quadri sindromici correlati, schizofrenia) l'eziopatogenesi è ancora scarsamente caratterizzata. Numerose evidenze sperimentali supportano l'origine multifattoriale di tali condizioni patologiche, per cui fattori genetici, epigenetici e socioambientali e la loro interazione in fasi critiche dello sviluppo ontogenetico possono indurre alterazioni precoci nell'organizzazione funzionale di circuiti neurali, soprattutto corticali. In tale ottica, il progetto si propone di indagare il ruolo di differenti fattori di rischio nell'induzione di alterazioni neurocomportamentali riportabili a disturbi comportamentali e psichiatrici dell'età evolutiva. Verranno perciò utilizzati sia roditori soggetti a insulto ipossico perinatale (le complicazioni ostetriche rappresentano uno dei probabili fattori di rischio per la schizofrenia) o ad esposizioni ontogenetiche a xenobiotici attivi sul sistema nervoso centrale (farmaci antiretrovirali, pesticidi organofosforici) sia topi geneticamente modificati (ie topi *knock-out* per il gene della reelina, che nell'eterozigote sembrano rappresentare un promettente modello di disturbo neuropsichiatrico). Questi modelli sono già disponibili presso il Reparto di Neuroscienze comportamentali dell'ISS, e sono ampiamente validati in letteratura. Nei modelli animali in studio verranno analizzati parametri a) comportamentali (con particolare riferimento ai comportamenti sociali e alle funzioni cognitive), b) neurochimici (ie neurotrofine, proteine coinvolte nella sinaptogenesi, marcatori di infiammazione, e sistemi recettoriali per differenti neurotrasmettitori, soprattutto dopamina), c) ormonali e d) immunitari (presenza di autoanticorpi). Sia negli animali con "danno" genetico che in quelli con "danno" ambientale potrà essere valutato l'effetto di ulteriori manipolazioni socioambientali nella fase neonatale precoce (separazione materna, manipolazione del comportamento materno o dell'ambiente del nido, ulteriore esposizione a tossici ambientali, o arricchimento ambientale) per mettere a punto validi modelli di rischio multifattoriale. Il lavoro di laboratorio verrà integrato da ricerche condotte sul campo, utilizzando popolazioni selvatiche di vertebrati, anche grazie a specifici finanziamenti messi a disposizione da CNR e IMONT.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di modelli animali di rischio multifattoriale e aumento delle conoscenze sul contributo dei diversi fattori all'eziopatogenesi delle patologie neuropsichiatriche in età evolutiva.

Identificazione di indici precoci di danno funzionale del sistema nervoso centrale da correlare con parametri biochimici e molecolari in modelli animali di disordini del neurosviluppo

Valutazione del ruolo delle variabili socioambientali e dei possibili interventi "terapeutici" attraverso variazioni dell'ambiente fisico e sociale (procedure di arricchimento)

Identificazione di meccanismi patogenetici tuttora sconosciuti e di potenziali nuovi *target* molecolari per lo sviluppo di farmaci in modelli animali di ADHD, schizofrenia o quadri ansioso/depressivi.

Trasferibilità dei risultati

Il valore traslazionale del progetto risiede primariamente nella messa a punto di validi modelli animali di rischio multifattoriale per la salute mentale in età evolutiva. L'attuazione di politiche sanitarie di prevenzione a livello europeo richiede un approccio aggiornato alla valutazione del rischio nelle popolazioni vulnerabili, quali i bambini; che tenga conto delle specificità fisiologiche e ambientali dell'età evolutiva, e della possibilità di esposizioni a molteplici fattori di rischio. In questo contesto, l'impiego di modelli animali appropriati, oggi mancanti, nel quale valutare il ruolo di variabili multiple e gli effetti a medio e lungo termine, può fornire indicazioni determinanti a) per individuare gruppi di popolazione a rischio, b) per la selezione delle variabili socioambientali e c) per la selezione di indici comportamentali nelle popolazioni esposte.

La caratterizzazione comportamentale in diversi modelli animali di insulto cerebrale perinatale, e in particolare in modelli di rischio multifattoriale, può contribuire sia alla stesura di linee guida (relative per esempio alla somministrazione di farmaci in età evolutiva e ai protocolli per la valutazione della loro neurotossicità) sia all'aggiornamento delle linee guida esistenti o di recente elaborazione, quali le nuove linee guida OCSE per la valutazione della neurotossicità durante lo sviluppo.

Infine, i modelli animali di disturbi del neurosviluppo si prestano alla valutazione di nuove strategie terapeutiche, non necessariamente associate a trattamenti farmacologici, ma relative alla modificazione di contesti socioambientali sfavorevoli, e all'intervento riabilitativo (arricchimento ambientale) da trasferire alla clinica.

Fattori precoci di rischio per i disordini neuropsichiatrici: approcci comparati animali per lo studio delle interazioni fra geni e ambiente

Il Progetto si inquadra nella collaborazione scientifica tra l'ISS (Reparto di Neuroscienze comportamentali) e l'NICHD di Bethesda (Prof. Steven Suomi).

Fattori genetici e "esperienziali" possono contribuire alla patogenesi della malattia mentale. Numerosi studi indicano che manipolazioni del rapporto madre-prole possono risultare in alterazioni di lungo termine nei sistemi neurobiologici alla base del comportamento emotivo e sociale, soprattutto in risposta a eventi stressanti. Mancano tuttavia studi dettagliati sui mediatori alla base di tali effetti di lungo termine. Studi recenti suggeriscono che alla base della patogenesi di fenomeni depressivi vi sia una ridotta plasticità in determinati sistemi neuronali, come risultato di modifiche nell'espressione di fattori neurotrofici (NGF e BDNF). È possibile ipotizzare che alterazioni precoci nei livelli di NGF e/o BDNF possano indurre una maggiore vulnerabilità a sviluppare disturbi dell'umore e sindromi depressive o ansiose.

Obiettivo del progetto sarà uno studio longitudinale e comparato, condotto sia in roditori sia in primati non umani, per l'individuazione di marcatori precoci di rischio per lo sviluppo di patologie ansiose o depressive. L'ipotesi che si intende saggiare è che esperienze avverse precoci, quali la separazione tra madre e piccolo, durante fasi precoci dello sviluppo dei mammiferi, possano influenzare l'ontogenesi del sistema nervoso centrale, determinando alterazioni nella plasticità neuronale in aree del sistema nervoso centrale implicate nella risposta a eventi stressanti e nella patogenesi di disturbi dell'umore e di sindromi depressive.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo del progetto è l'individuazione di indici comportamentali e neurobiologici di ridotta plasticità neuronale, anche al fine di sviluppare nuovi bersagli terapeutici per la prevenzione e la cura di patologie legate ai disturbi dell'umore e dell'ansia.

1a fase: Caratterizzazione degli effetti di separazioni materne ripetute (roditori) e differenti tipi di allevamento (materno o artificiale, primati) su indici comportamentali e misure endocrine in risposta a eventi stressanti (corticosterone, cortisolo, adrenocorticotropina). Misurazione dei livelli ematici di neurotrofine (NGF e BDNF) e loro correlazione con indici comportamentali e storie evolutive, al fine di distinguere modifiche stato-dipendenti di questi mediatori da quelle tratto-dipendenti. Individuazione di risposte comportamentali individuali in dipendenza delle diverse storie evolutive e risposta a challenge farmacologica con appropriati farmaci antidepressivi.

2a fase: Studio correlazionale tra polimorfismi genetici della molecola di trasporto della serotonina, risposta comportamentale a eventi avversi precoci e risposta a farmaci antidepressivi. Simili studi saranno condotti, in parallelo, in roditori sottoposti a separazione materna precoce.

Trasferibilità dei risultati

Messa a punto di protocolli in modelli animali di riferimento per l'identificazione precoce di fattori di rischio per lo sviluppo dei disordini dell'umore o sindromi depressive.

Identificazione di metodologie in grado di attenuare o prevenire l'insorgere di patologie psichiatriche.

Identificazioni di nuovi marcatori periferici di ridotta plasticità neuronale di roditori e primati non umani.

I dati ottenuti potrebbero indirizzare l'industria farmaceutica verso lo sviluppo di terapie farmacologiche innovative e fornire indicazioni utili per una strategia farmacologica individuale, in dipendenza della storia evolutiva e il particolare *background* genetico (farmacogenomica).

I dati raccolti saranno disseminati mediante pubblicazioni su riviste internazionali, e partecipazione a Congressi nazionali e internazionali. Si prevede l'organizzazione di un *Workshop* internazionale (presso l'ISS) in cui saranno presentati i dati raccolti nell'ambito di questo e altri progetti ISS-NIH.

Geni bersaglio e meccanismi molecolari responsabili dell'attività immunomodulatoria della vitamina D3 in cellule dendritiche umane

1,25(OH)2D3, la forma biologicamente attiva della vitamina D3 è un ormone pleiotropico che, oltre a svolgere un ruolo centrale nel metabolismo del calcio e nell'omeostasi del tessuto osseo, è dotato di importanti attività immunomodulatorie. L'obiettivo principale di questo progetto è la caratterizzazione dei meccanismi d'azione dell'1,25(OH)2D3 in cellule dendritiche (DC) umane mieloidi e plasmacitoidi. Le DC sono riconosciute come uno tra i più importanti bersagli cellulari dell'1,25(OH)2D3 nel sistema immune. 1,25(OH)2D3 ne inibisce infatti il differenziamento, e interferisce con numerosi aspetti della loro attivazione/maturazione,

indirizzandole verso l'acquisizione di proprietà tollerogeniche. Dati recenti ottenuti dal nostro gruppo hanno dimostrato che l'effetto immunosoppressivo dell' 1,25(OH)2D3 sulle DC è associato ad una potente regolazione negativa della loro attività chemiotattica, e all'inibizione dell'espressione di IRF4, un fattore trascrizionale chiave per il differenziamento mieloide. Il presente progetto è focalizzato su: 1) studio dell'effetto dell'1,25(OH)2D3 sulla regolazione, a livello trascrizionale, del differenziamento e maturazione delle DC; 2) studio della via di trasduzione del segnale dell'1,25(OH)2D3, e di come questa interferisca con la trasduzione del segnale delle chemochine; 3) studio dei meccanismi molecolari alla base della capacità di DC esposte a 1,25(OH)2D3 di espandere preferenzialmente cellule T regolatrici invece che effettrici.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi proposti porteranno ad una dettagliata caratterizzazione dei meccanismi d'azione dell'1,25(OH)2D3 in diversi modelli di cellule dendritiche, e in particolare in DC generate *in vitro* da monociti in presenza di diversi *cocktails* di citochine, e nelle sottopopolazioni di DC circolanti nel sangue periferico, le DC mieloidi e plasmacitoidi. In particolare, verrà definito l'effetto dell'1,25(OH)2D3 su 1) fattori trascrizionali importanti per lo sviluppo e/o le attività funzionali delle DC (es. fattori appartenenti alle famiglie NFkB, STAT and IRF), 2) molecole coinvolte nella trasduzione del segnale delle chemochine (molecole del citoscheletro, GTPasi e chinasi intracellulari); 3) molecole co-stimolatorie e co-inibitorie e fattori solubili responsabili dell'induzione di cellule T regolatorie. Lo studio comparativo in diversi modelli di cellule dendritiche umane permetterà inoltre di definire i meccanismi d'azione dell'1,25(OH)2D3 anche in cellule finora poco caratterizzate dal punto di vista della loro risposta a questo importante agente immunomodulatorio, come le due sottopopolazioni di DC circolanti nel sangue periferico. L'insieme di questi risultati amplierà le conoscenze di base sui meccanismi attraverso i quali l'1,25(OH)2D3 induce tolleranza immunitaria modulando le funzioni delle DC.

Trasferibilità dei risultati

L'1,25(OH)2D3 e i suoi analoghi si sono dimostrati efficaci in numerosi modelli sperimentali animali, sia nel prevenire e curare diverse malattie autoimmuni, che nel prolungare la sopravvivenza di trapianti. Questi composti sono anche entrati di recente nella pratica clinica, per il trattamento di malattie immuno-mediate, come ad esempio la psoriasi. La conoscenza di base dei meccanismi responsabili dell'induzione di tolleranza immunitaria da parte dell'1,25(OH)2D3 contribuirà al suo impiego razionale in un più ampio spettro di interventi terapeutici.

High pressure/temperature inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents in biological products

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo (malattia di Creutzfeldt-Jakob, MCV) e gli animali (scrapie, encefalopatia spongiforme bovina, BSE). Le EST hanno lunghi tempi di incubazione in cui l'infezione non è rilevabile, ma il soggetto può albergare titoli rilevanti dell'agente patogeno (definito prione) in vari distretti corporei. Di conseguenza numerosi prodotti biologici di origine animale (alimenti e farmaci) e umana (sangue e plasmaderivati) derivanti da soggetti infetti non diagnosticati potrebbero causare la trasmissione dell'infezione.

L'importanza di una metodica in grado di ridurre l'infettività da prioni in queste matrici deriva dalla particolare resistenza che questi agenti mostrano alle comuni procedure di decontaminazione microbiologica. I prioni possono essere inattivati soltanto utilizzando metodi chimici o fisici estremi che solo in rari casi possono essere utilizzati per innalzare il livello di

sicurezza dei prodotti biologici, poiché ne altererebbero irreversibilmente le caratteristiche biochimiche.

Il nostro gruppo ha già verificato l'utilità del trattamento combinato con brevi impulsi ad alta pressione e ad alta temperatura (già usato dall'industria alimentare) per l'inattivazione dei prioni. Lo scopo fondamentale del progetto è di studiare nei dettagli le condizioni per l'applicazione di questo nuovo trattamento.

Risultati attesi nel triennio

Dimostrare la dipendenza dell'efficienza di inattivazione dalla temperatura e dalla pressione.

Verificare se i trattamenti consentono di rimuovere completamente basse dosi di infettività.

Valutare l'efficienza di inattivazione dell'infettività in presenza di differenti substrati biologici.

Valutare la suscettibilità all'inattivazione di diversi ceppi di EST (scrapie, CJD, BSE).

Analizzare le modifiche biochimiche e morfologiche della PrPTSE sottoposta al trattamento ad alta pressione.

Dimostrare la ripetibilità degli effetti di decontaminazione ottenibili con il trattamento.

Trasferibilità dei risultati

Le misure di precauzione adottate dai governi per arginare la diffusione delle malattie da prioni (in particolare l'encefalopatia spongiforme bovina e la sua forma umana la variante di malattia di Creutzfeldt-Jakob) come ad esempio il divieto di usare farine di carne per l'alimentazione dei ruminanti, la rimozione dei materiali a rischio specifico dagli animali macellati e l'esclusione dalle donazioni di sangue dei soggetti a rischio sono già in grado di garantire un buon livello di sicurezza di questi prodotti. Tuttavia l'identificazione di episodi di trasmissione di vCJD con il sangue e la recente comparsa di casi di BSE negli Stati Uniti sottolinea l'importanza di avere ulteriori sistemi che possano incrementare la sicurezza di cibi e prodotti terapeutici.

La disponibilità di una metodica di inattivazione dei prioni (di cui l'ISS possiede il brevetto) può avere evidenti e immediati vantaggi dal punto di vista della sanità pubblica e del possibile ritorno economico.

HPT inactivation

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo (malattia di Creutzfeldt-Jakob, MCJ) e gli animali (scrapie, encefalopatia spongiforme bovina, BSE). L'epidemia di BSE che ha colpito soprattutto il Regno Unito ma anche svariati paesi europei ed extraeuropei ha causato enormi danni economici all'industria zootecnica e ha prodotto drammatiche conseguenze in ambito di sanità pubblica animale e umana con la comparsa della variante di MCJ nell'uomo. Una delle misure che ha permesso di ridurre l'epidemia di BSE è stata la rimozione dei cosiddetti materiali a rischio specifico rappresentati essenzialmente dal sistema nervoso centrale e da alcuni altri organi che nei bovini albergano infettività. Questa misura ha però causato l'accumulo di milioni di tonnellate di materiale biologico per il quale sarebbe necessario identificare un possibile impiego alternativo alla distruzione. Per poter procedere al reimpiego bisognerebbe però trattare questo materiale con una procedura in grado di ridurre l'infettività da BSE eventualmente presente.

Il nostro gruppo ha già verificato l'utilità del trattamento combinato con brevi impulsi ad alta pressione e ad alta temperatura (già usato dall'industria alimentare) per l'inattivazione dei prioni. Lo scopo fondamentale del progetto è di studiare l'applicabilità di questo trattamento ai materiali a rischio specifico

Risultati attesi nel triennio

Lo studio prevede la preparazione di una serie di campioni contenenti materiali a rischio specifico intenzionalmente contaminati con agenti delle EST che saranno sottoposti a diverse condizioni di trattamento con alta pressione/alta temperatura allo scopo di:

Dimostrare la dipendenza dell'efficienza di inattivazione dalla temperatura e dalla pressione.

Verificare se i trattamenti consentono di rimuovere completamente basse dosi di infettività.

Valutare l'efficienza di inattivazione dell'infettività in presenza di differenti materiali a rischio specifico.

Valutare la suscettibilità all'inattivazione di scrapie e BSE.

Dimostrare la ripetibilità degli effetti di decontaminazione ottenibili con il trattamento.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo di metodi di inattivazione dei prioni ad alta pressione e temperatura (di cui l'ISS possiede il brevetto) che possano consentire una efficiente decontaminazione dei materiali a rischio specifico che li renda idonei al reimpiego, porterà evidenti vantaggi sia dal punto di vista della salute pubblica che da quello economico e industriale.

Human transgenic mice for investigation of tse pathogenesis

Lo studio della malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ) si può avvalere di topi transgenici in cui sia stato introdotto il gene della proteina prionica umana.

La creazione di topi transgenici che esprimono le 3 combinazioni alleliche della PrP umana (Met/Met, Val/Val, Met/Val) al sito polimorfico 129 (ampiamente riconosciuto come fattore di suscettibilità per l'uomo) consente di inoculare e studiare casi di MCJ con fenotipo clinico particolare per valutare le caratteristiche della malattia nei topi con diverso genotipo della PrP. L'uso di questi topi transgenici permette di affrontare uno dei temi chiave nella ricerca sulle malattie spongiformi trasmissibili (EST), che è quello della definizione dei ceppi e dei *marker* biochimici o patologici ad essi eventualmente associati.

Il nostro gruppo fa parte di un consorzio europeo che ha come scopo la trasmissione sperimentale a topi transgenici di casi di MCJ appositamente selezionati nei diversi paesi europei.

Questo progetto sarà in grado di incidere sulla futura sorveglianza europea delle EST fornendo dati su potenziali trasmissioni iatrogene e eventuali nuovi pericoli che derivano dall'insorgenza di nuovi fenotipi, come è già successo per la variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob. Inoltre l'uso di questo modello animale nei centri di ricerca europei potrà consentire l'armonizzazione dei protocolli e di conseguenza la produzione di dati realmente comparabili tra loro.

Risultati attesi nel triennio

Standardizzazione delle trasmissioni primarie umane in una nuova linea di topi transgenici che esprimono la PrP umana allo scopo di studiare il ruolo del polimorfismo al codone 129.

Studio della prevenzione e il trattamento delle EST a livello molecolare analizzando il ruolo che il gene della PrP riveste nello sviluppo della malattia sia quando è espressa nell'inoculo che quando è espressa nell'ospite.

Generazione di i dati generati in ciascun laboratorio siano direttamente comparabili.

Studio e caratterizzazione dei ceppi infettanti associati alle EST valutando il grado di eterogeneità dei ceppi circolanti nella popolazione umana.

Definizione delle correlazioni esistenti tra l'agente infettivo e la manifestazione fenotipica della malattia.

Studio delle differenze tra i diversi ceppi infettanti associati ad EST di diversa etiologia.

Trasferibilità dei risultati

Dallo sviluppo del progetto si otterranno grafici del profilo delle lesioni dei topi inoculati e foto delle lesioni patologiche dei topi ammalati.

Si produrranno inoltre Immunoblots e scansioni della PrP patologica accumulata nei cervelli dei topi ammalati come pure l'analisi del profilo del glicotipo delle PrP accumulata. Si otterranno inoltre degli inoculi di CJD adattati al topo.

Queste informazioni sono di estrema importanza per l'epidemiologia, la prevenzione e la diagnosi delle EST.

Identification of genetic markers for diagnosis and prognosis in rare tumors

Il cancro origina da un accumulo di mutazioni genetiche che regolano la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule, la loro adesione e la loro mobilità. Le mutazioni possono svilupparsi in tempi molto differenti, anche sotto l'influenza di stimoli esterni. Gli approcci utilizzati per lo studio della genetica dei tumori vanno dalla citogenetica classica (metafasi analizzate con diverse tecniche di bandeggio), alla citogenetica molecolare (*Comparative Genomic hybridization*-CGH) e alla biologia molecolare (studio della perdita di eterozigotità, analisi di microsatelliti, *arrays* ecc.).

Un'analisi eseguita con CGH e analisi di microsatelliti su 20 casi, benigni e maligni, di tumori rarissimi del pancreas endocrino di tipo non funzionante, ha mostrato un'alta eterogeneità genetica e una correlazione tra il numero di anomalie e i dati clinico-patologici. I nostri dati, insieme a quelli della letteratura, rafforzano l'ipotesi che la progressione dei tumori pancreatici endocrini verso la malignità richiede un accumulo di alterazioni genetiche; inoltre abbiamo focalizzato l'attenzione su alcune regioni cromosomiche (es. 1p13, 6q25, 6q27), possibilmente coinvolte nello sviluppo e/o malignità di questi tumori.

Gli studi attuali e futuri sono focalizzati sull'analisi di tumori rari negli adulti e nei bambini, mediante l'integrazione di varie strategie, allo scopo di rilevare alterazioni genetiche e correlarle con i dati clinico-patologici.

Risultati attesi nel triennio

Rilevamento e caratterizzazione di alterazioni genetiche in campioni di DNA da pazienti affetti da tumori rari e loro caratterizzazione con dati clinico-patologici.

Trasferibilità dei risultati

Una migliore comprensione della genetica dei tumori rari è importante in quanto può fornire nuovi marcatori atti ad effettuare una diagnosi più precoce e accurata e una migliore prognosi; inoltre l'identificazione di nuovi geni coinvolti nella tumorigenesi ha la potenzialità di individuare *target* per interventi terapeutici mirati.

Identificazione di antigeni tumore-associati e loro uso per nuove strategie terapeutiche basate sulla combinazione di immunoterapia e chemioterapia in pazienti con carcinoma del colon-retto

Il cancro del colon-retto (CRC) è uno dei tumori più frequenti nei paesi occidentali ed è considerato scarsamente immunogenico. Tuttavia i progressi nella immunobiologia dei tumori, nei metodi per l'identificazione di nuovi antigeni tumore associati (TAA) e il potenziamento *in vivo* delle risposte immunitarie mediante linfodeplezione hanno contribuito ad aprire nuove prospettive nell'immunoterapia del CRC.

Due sono i principali obiettivi di questo progetto:

1) Caratterizzazione di nuovi antigeni associati al CRC. In particolare, caratterizzazione del COA-1, un TAA recentemente identificato dalla dott.ssa Maccalli che fa parte del nostro gruppo. Saranno studiati, mediante analisi genomica, alcuni meccanismi responsabili della

variabilità di questo antigene e dell'influenza di eventuali varianti sulla trasformazione e progressione neoplastica. Inoltre, saranno condotti studi per la caratterizzazione biochimica della proteina COA-1, del suo pattern di fosforilazione e di suscettibilità agli enzimi proteolitici e della sua espressione nei vari compartimenti della cellula tumorale. Saranno anche selezionati epitopi ristretti per il sistema HLA-A2 da usare per la stimolazione *in vitro* dei PBMC di pazienti con CRC. Nel loro insieme questi studi saranno indirizzati a validare l'uso di COA-1 antigene per una immunizzazione attiva e a disegnare nuove strategie vaccinali per generare risposte immuni efficaci contro il tumore del colon retto.

2) Trasferimento adottivo di linfociti autologhi immuni contro il CRC dopo trattamento chemioterapico non mieloablativo. Infatti studi condotti in modelli animali hanno mostrato che linfociti immuni contro un tumore, reinfusi in topi portatori dello stesso tumore dopo trattamento con ciclofosfamida vanno incontro ad una notevole espansione e solo i linfociti dotati di specificità verso le cellule tumorali infiltrano la massa tumorale. Una parte significativa del progetto sarà dedicata alla caratterizzazione dei linfociti tumore specifici isolati dalle lesioni di CRC. Questo lavoro sarà svolto in collaborazione con ricercatori del *National Cancer Institute* (NCI) presso l'NIH di Washington e si avvarrà anche dell'uso di un modello di topi SCID umanizzati da noi messo a punto in ISS. Inoltre, sempre in collaborazione con l'NCI, sarà condotto uno studio clinico per valutare l'homing e la proliferazione dei linfociti infiltranti il tumore (TIL) reinfusi in pazienti con CRC dopo condizionamento con chemioterapico.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si pone il fine di ottenere una caratterizzazione biologica e funzionale di un nuovo TAA (COA-1) che è stato identificato dalla dott.ssa Maccalli nel contesto di un programma di ricerca svolto nel laboratorio del dott. Rosenberg all'NCI/NIH. Si verificherà se esiste una risposta immune sistemica contro COA-1 in pazienti con CRC a diverso stadio di malattia e se tale risposta può correlare con la progressione della malattia stessa. Si verificherà, inoltre se COA-1 possa rappresentare un marcatore molecolare prognostico. Insieme a questi studi, altri ne verranno condotti, per identificare nuovi TAA del CRC tramite lo studio della specificità antigenica dei linfociti infiltranti la massa neoplastica e dotati di attività antitumorale *in vitro*. I risultati degli studi precedentemente indicati saranno utilizzati per identificare nuovi vaccini antitumorali per immunizzare pazienti con CRC e per caratterizzare linfociti T con attività antitumorale da usare in protocolli di trasferimento adottivo in combinazione con chemioterapia linfopenizzante.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione di un nuovo antigene tumore associato al carcinoma del colon retto rappresenta uno strumento essenziale per la definizione di nuove strategie vaccinali antitumorali. Oltre al suo uso come strumento di immunoterapia, lo studio della biologia del COA-1 permetterà di conoscere funzioni di questa proteina nella espressione delle attività cellulari e, in particolare, nella funzioni della cellula neoplastica. Esiste già una domanda congiunta ISS-NIH di brevetto per la protezione intellettuale e lo sfruttamento industriale del COA-1

Identificazione di parametri biochimici e genetici per la diagnosi precoce e il follow-up della malattia di Alzheimer: studi clinici e sperimentali

Il danno ossidativo è un meccanismo patogenetico comune a molte malattie neurodegenerative, tra cui la MA. L'identificazione di fattori genetici e ambientali coinvolti nella genesi e nell'espressione del danno è di primaria importanza per elaborare strategie di intervento farmacologico e per valutarne l'efficacia. La natura multifattoriale della MA e i risultati non soddisfacenti delle terapie fino ad oggi sperimentate, suggeriscono che la strada da

seguire sia quella di un approccio che integri e combini più aspetti della malattia, tenendo conto della suscettibilità individuale e i meccanismi patogenetici generali.

Nella nostra ricerca la complessità dei fenomeni alla base della MA è affrontata con un approccio integrato e multidisciplinare, articolata su tre livelli:

Studi clinici per la valutazione di parametri plasmatici correlabili alla vulnerabilità o protezione individuale all'insulto di tipo ossidativi, e l'analisi genetica dei fattori di suscettibilità legati ai livelli di *stress* ossidativi.

Studi in modelli animali per l'identificazione di fattori di protezione o di vulnerabilità ai fenomeni neurodegenerativi e loro correlazione ai livelli di *stress* ossidativo.

Studi in modelli *in vitro* per l'analisi dei meccanismi molecolari che controllano i processi di trasporto di complessi macromolecolari alla terminazione sinaptica e che giocano un ruolo critico nel deficit cognitivo

Risultati attesi nel triennio

Gli studi clinici consentiranno da un lato di stabilire se la capacità di difesa dall'insulto ossidativo è alterata nei pazienti affetti da patologie neurodegenerative e se tali eventuali alterazioni sono conseguenti al decorso della malattia o ne possono predire l'andamento. Dall'altro lato, l'analisi genetica consentirà l'identificazioni di eventuali mutazioni geniche di utilità sia nella diagnosi precoce e accurata della malattia, sia nella messa a punto di nuove metodologie diagnostiche per la caratterizzazione di soggetti a rischio.

Gli studi *in vivo* e *in vitro* consentiranno di identificare meccanismi molecolari e nuovi possibili bersagli di intervento terapeutico legati alle alterazioni dei livelli di *stress* ossidativo e alla presenza di particolari genotipi, in base ad un approccio farmacogenetico. L'attività di ricerca inerente al progetto di durata biennale è iniziata nel febbraio 2005 e coinvolge 4 unità operative interne al Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze. In questo primo periodo di attività sono stati reclutati i pazienti per gli studi clinici e stabilite le condizioni in cui effettuare l'analisi biochimica e il profilo genetico. Allo stesso modo sono stati avviati gli studi *in vitro* e in modelli animali.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di parametri biochimici per l'individuazione di soggetti particolarmente a rischio, per la diagnosi precoce, il *follow-up* della malattia e l'efficacia di terapie anti-ossidanti. La disponibilità di un indice plasmatico in grado di valutare lo stato anti-ossidante totale consentirà di valutare la necessità di una terapia che incrementi la resistenza al danno ossidativo e l'efficacia di tali terapie, in maniera non costosa e non invasiva per il paziente.

Identificazione di parametri biochimici e genetici per la diagnosi precoce e il *follow-up* della malattia di Alzheimer (MA): studi clinici e sperimentali

Lo studio si propone di analizzare sia i geni noti coinvolti nella MA ereditaria, che quelli di suscettibilità possibilmente associati allo stress ossidativo e all'invecchiamento come il gene p66ShcA. Lo studio genetico si avvale della raccolta di DNA ottenuta dalla collaborazione con alcune UVA. (Unità Valutativa Alzheimer) e sarà condotto, oltre che in soggetti affetti da MA di tipo sporadico, su campioni provenienti da grandi *pedegrees* familiari, particolarmente utili per l'analisi del rapporto genotipo/fenotipo e nei quali la MA, ad esordio precoce, si trasmette da molte generazioni come carattere autosomico dominante. Lo studio prevede: i) l'identificazione di nuove famiglie italiane affette dalla FAD (*Familial Alzheimer Disease*) per l'analisi delle mutazioni note (nei geni APP, PSEN1 e PSEN2), come screening iniziale nei pazienti affetti; ii) l'analisi per la ricerca di nuove mutazioni patologiche in geni potenzialmente coinvolti nella MA, come ad esempio i cofattori della gamma-secretasi: la proteasi chiave nel processo di formazione delle placche amiloidi; iii) l'analisi del gene p66ShcA su pazienti FAD

e SAD (*Sporadic Alzheimer Disease*) per l'individuazione di possibili polimorfismi e/o mutazioni correlabili ai diversi fenotipi della MA e ai valori plasmatici del PAO (potere anti-ossidante); iv) genotipizzazione per il gene dell'Apolipoproteina E (ApoE), il maggior fattore di rischio genetico associato alla MA e sua correlazione con gli altri alleli di suscettibilità eventualmente identificati.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi genetica consentirà l'identificazione di eventuali mutazioni geniche di utilità sia nella diagnosi precoce e accurata della malattia, sia nella messa a punto di nuove metodologie diagnostiche per la caratterizzazione di soggetti a rischio. Durante il primo anno del progetto abbiamo iniziato, in collaborazione con alcuni centri neurologici, la raccolta dei campioni ematici di circa 100 soggetti affetti dalla forma sporadica (SAD), circa 40 affetti dalla forma familiare (FAD), oltre ad un centinaio di soggetti neurologicamente sani utilizzati come controllo. L'analisi delle mutazioni genetiche autosomiche dominanti (nei geni APP, PSEN1 e PSEN2), come *screening* iniziale di diagnosi molecolare in pazienti affetti dalla FAD, ha portato all'individuazione di una mutazione (E318G), sull'esone 10 del gene PSEN1, non rilevata in nessuno dei controlli analizzati. Inoltre, su tutti i campioni disponibili è stata condotta un'analisi genetica dei possibili fattori di suscettibilità in alcuni geni coinvolti nel complesso della gamma-secretasi. In particolare, lo *screening* effettuato sul gene PEN-2 ha rilevato la presenza di una variante genica che sembra mostrare un'associazione significativa con i casi ad insorgenza precoce di malattia d'Alzheimer e che verrà correlata, sia ai diversi fenotipi della MA, che ai valori plasmatici del PAO.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di parametri molecolari correlati ai parametri biochimici, consentirà l'individuazione di soggetti a rischio, per la diagnosi precoce. I dati raccolti saranno quindi diffusi alla comunità scientifica nazionale e internazionale mediante adeguate pubblicazioni scientifiche e mediante la partecipazione a convegni nazionali e internazionali

Immunopatogenesi e terapia della sclerosi multipla

Le attuali conoscenze sulla patogenesi della sclerosi multipla (SM) suggeriscono un coinvolgimento della risposta immunitaria T-mediata nel processo infiammatorio che colpisce la sostanza bianca, e il contributo della risposta umorale (anticorpo-mediata) nell'evoluzione delle lesioni demielinizzate. Studi condotti dal Dr. Roland Martin e dal Dr. Paolo Muraro della Sezione di Immunologia Cellulare dell'NIH (NINDS) hanno identificato la proteina basica della mielina come uno dei possibili antigeni della risposta T-mediata. Uno dei problemi principali nell'identificare i linfociti T e B con ruolo patogenico nella SM e le loro specificità antigeniche riguarda il fatto che gli studi immunologici sono generalmente ristretti alle popolazioni periferiche, piuttosto che al tessuto patologico dove ci si aspetta che i linfociti patogenici si accumulino in modo preferenziale. Combinando le competenze del gruppo NIH nel tracciare cellule T patogeniche e studiare la reattività di cellule T alla proteina basica della mielina con l'esperienza del gruppo ISS nelle tecniche neuropatologiche e di microdissezione laser, in particolare nell'identificazione di strutture simil-linfoidi che potrebbero facilitare e sostenere risposte immunitarie compartimentalizzate nel sistema nervoso centrale, questo progetto intende acquisire nuove conoscenze sui processi immunitari associati alla SM. La comprensione di questi aspetti riveste particolare importanza se si considera che il trattamento sistemico della SM con i farmaci attualmente approvati non è in grado di bloccare la progressione della malattia; probabilmente a causa della incapacità di agire sulle risposte confinate al tessuto cerebrale.

Risultati attesi nel triennio

Questa ricerca ha come obiettivo ultimo l'acquisizione di nuove conoscenze sui meccanismi immunopatogenetici che sottendono alla formazione di lesioni demielinizzate e ai fenomeni neurodegenerativi in corso di sclerosi multipla. In particolare, si intende esaminare i repertori T (recettori dei linfociti T) e B (regioni variabili delle immunoglobuline) e il comportamento linfocitario (per esempio, proliferazione, attivazione) in differenti compartimenti del sistema nervoso centrale (meningi e parenchima cerebrale), al fine di valutare se il processo di neogenesi linfoide (formazione di follicoli B ectopici), tipicamente ristretto alle meningi, possa portare alla espansione e maturazione di linfociti capaci di infiltrare il parenchima cerebrale.

Trasferibilità dei risultati

Una migliore comprensione dei meccanismi che sono alla base dei processi immunitari confinati nel tessuto cerebrale in corso di SM può fornire indicazioni importanti per lo sviluppo di strategie terapeutiche più mirate e efficaci per curare i pazienti affetti da sclerosi multipla. Si prevede che questo progetto possa avere un impatto importante nel modellare le attuali teorie sulla immunopatogenesi della SM, spostando, almeno in parte, il *focus* della ricerca sui processi immunitari intracerebrali e quindi sullo sviluppo di nuovi composti terapeutici in grado di agire su tali processi.

Immunoterapia dell'infezione da HIV basata su cellule dendritiche autologhe generate in presenza di IFN di tipo I

Le cellule dendritiche (DC), sono APC professioniste, capaci di attivare il sistema immune in modo efficiente verso antigeni virali e tumorali. Abbiamo precedentemente descritto la generazione di DC da monociti in presenza di GM-CSF e IFN di tipo I (IFN-DCs), evidenziando come risultino altamente efficaci nella generazione di una potente risposta immune cellulare e umorale.

Il progetto prevede uno studio comparativo della biologia e attività funzionale delle IFN-DCs da donatori sani e HIV-infetti, valutando la riattivazione del DNA provirale e il rilascio di particelle virali prima e durante il differenziamento dei monociti in DC. Saranno studiati fenotipo e biologia delle DC in seguito ad infezione con il virus.

Seguirà uno studio su IFN-DC elettroporate con mRNA corrispondenti a sequenze virali dei geni GAG e ENV. Lo studio consentirà di analizzare la capacità di stimolazione dei linfociti CD4 e CD8 da pazienti HIV-infetti o di induzione di risposta primaria in linfociti da donatori sani. Verrà valutata la risposta CD4 e una serie di parametri dell'immunità cellulare come produzione di IFN γ , IL-2, perforina, granzyme-B. Lo studio valuterà inoltre l'elettroporazione di mRNA corrispondenti a sequenze di geni regolatori virali (tat, rev, nef) o di citochine con potenziale effetto adiuvante. Tali studi sono finanziati dal Ministero della Salute (Progetto AIDS terapia e patogenesi).

Risultati attesi nel triennio

Con questa attività di ricerca, ci aspettiamo di raccogliere nuove informazioni riguardo la biologia e funzionalità delle IFN-DC, nell'ottica del loro utilizzo nella pratica clinica. La serie di studi che effettueremo ci permetterà di valutare la possibilità di isolare e differenziare con successo i monociti di pazienti HIV-infetti in IFN-DC efficienti dal punto di vista funzionale, definendo, al contempo, le condizioni ottimali per l'isolamento delle cellule e la loro coltivazione in accordo con le norme GMP dettate dagli organi Europei. In particolare, intendiamo determinare la possibilità di ottenere IFN-DCs funzionali da soggetti HIV-infetti sottoposti a terapia antiretrovirale (HAART) e definire gli immunogeni ideali in grado di indurre una risposta immune efficace contro il virus. Nella fase finale, intendiamo sviluppare il potenziale terapeutico delle IFN-DC e definire protocolli di preparazione e utilizzo in condizioni

GMP di IFN-DC per il trasferimento in ambito clinico e più precisamente nell'immunoterapia di pazienti affetti da infezioni croniche e neoplasie.

Trasferibilità dei risultati

Numerosi studi attuali sono orientati verso strategie immunoterapeutiche sicure, efficaci e prive di tossicità, idonee ad attivare in maniera specifica le difese immunitarie nel corso di malattie infettive croniche e patologie neoplastiche. Questa tendenza riguarda gli stessi NIH-NIAID USA che, in anni recenti, sono stati promotori di studi clinici di fase I e II atti a valutare interventi immunoterapeutici basata sull'uso di DC nell'infezione da HIV. I nostri studi nel settore dell'immunoterapia con cellule dendritiche consentiranno di ottenere risultati potenzialmente trasferibili nell'ambito delle terapie sperimentali di particolare interesse sanitario. L'utilizzo di IFN-DCs come "adiuvanti cellulari" potrebbe rappresentare un reale avanzamento nel tentativo di curare o esercitare un controllo a lungo termine di neoplasie e infezioni croniche gravi, con particolare riferimento all'AIDS, consentendo di contenere l'infezione da HIV e i livelli viremici nei pazienti infetti.

Implementazione e uso del modello "hu-PBL-SCID mouse" per studi sullo sviluppo di vaccini anti-HIV

Nostri precedenti studi basati sull'uso del modello "hu-PBL-SCID mouse" hanno dimostrato l'utilità di tale modello per studi di patogenesi e sulle strategie vaccinali contro HIV. Una sezione del progetto è dedicata alla definizione di protocolli adatti a generare una efficace risposta immune HIV-specifica nel topo SCID ricostituito con PBL umani mediante il trasferimento di cellule dendritiche autologhe e al confronto dell'efficacia delle diverse classi di DC a diverso stadio maturativo nell'immunizzazione. Gli immunogeni utilizzati saranno rappresentati da: HIV-1 inattivato con AT-2 e una serie di mRNA codificanti sequenze virali quali: tat, gag e env. Una parte successiva del progetto riguarderà l'implementazione del modello SCID e il saggio degli immunogeni da utilizzare per la vaccinazione. Lo scopo principale di questa parte della ricerca è utilizzare il modello hu-PBL-SCID per studi tesi alla valutazione di candidati vaccini anti-HIV, la modifica e l'adattamento del modello hu-PBL-SCID per tale tipo di valutazione. Da nostri studi sulla migrazione di DC inoculate sottocute in topi SCID risulta che queste cellule sono in grado di migrare rapidamente in linfonodi e milza. Questo studio verrà ampliato e consentirà di valutare protocolli di vaccinazione di topi hu-PBL-SCID mediante inoculo sottocute di DC e candidati immunogeni. Consentirà altresì di valutare approcci di "DC-mRNA vaccination" utilizzando DC trasfettate con mRNA codificanti proteine di HIV trasferiti mediante inoculo sottocute. Finanziamento Prog. "ICAV".

Risultati attesi nel triennio

Con questo progetto di ricerca ci proponiamo di migliorare l'efficacia e quindi la potenzialità dell'uso del modello "hu-PBL-SCID mouse" quale approccio preclinico d'elezione per saggiare *in vivo* diverse strategie vaccinali contro HIV-1 basate su cellule immuni umane, dalla valutazione dell'attività di vaccini basati sulle cellule dendritiche alla diretta valutazione dei vari tipi di immunogeni e adiuvanti. Inoltre prevediamo di ottenere una serie di dati riguardanti l'efficacia di nuovi approcci basati sull'uso di mRNA corrispondenti a sequenze virali dei geni GAG e ENV di HIV. Verranno infine ottenute informazioni sulle caratteristiche di migrazione *in vivo* di cellule umane in risposta ad HIV, immunogeni selezionati e sostanze ad attività immunoregolatoria.

Trasferibilità dei risultati

Lo svolgimento del progetto permetterà di implementare modello "Hu-PBL-SCID mouse" e le strategie per monitorare e predire la risposta immune umana contro HIV. Lo studio consentirà altresì di migliorare il disegno di protocolli di immunizzazione. Gli studi descritti permetteranno

di esplorare le complesse interazioni tra diversi tipi cellulari umani e HIV-1 in un sistema *in vivo*. Le informazioni ottenute consentiranno l'utilizzo ottimale di questo piccolo modello animale, caratterizzato da bassi costi e potenzialità uniche per studiare in vivo interazioni tra HIV e cellule umane, per valutare e saggiare immunogeni, adiuvanti e protocolli in ambito pre-clinico, in interazione con altri gruppi di ricerca interni e esterni all'ISS, interessati allo sviluppo di strategie vaccinali e di immunoterapia dell'infezione da HIV. In particolare, lo svolgimento delle ricerche descritte porterà allo sviluppo di protocolli clinici di immunoterapia dell'infezione da HIV.

Implication of autoantibodies to receptor fragments in etiology of compulsive behavior and drug addiction

Il progetto ISS-NIH formalizza una serie di collaborazioni con: 1) il Prof Ronald Herning, NIDA, NIH (Baltimora, USA); 2) il Dr. Oleg Granstrem, "Pavlov Institute", S. Pietroburgo (Russia); 3) la Dr.ssa Paola Margutti, Dipartimento MIPI, ISS.

L'idea alla base del progetto è che le manifestazioni di comportamenti devianti, di rilevanza neuropsichiatrica, possano avere una componente di carattere auto-immune, sia come possibile concausa che come possibile conseguenza. Il presente progetto rivolgerà particolare interesse a quelle manifestazioni che si riscontrano nell'uomo a partire dalla fase dell'adolescenza, quali la schizofrenia e/o la tossicodipendenza. Infatti, è stato riportato in letteratura che il siero di pazienti psichiatrici (es. gli schizofrenici) e/o di tossicomani (es. gli eroinomani) può presentare alterati titoli di una serie di auto-anticorpi diretti contro diversi *target* cerebrali, in particolare neuro-recettori e neuro-trasmettitori.

Pertanto, il progetto prevede di valutare : 1) L'effettiva presenza di auto-anticorpi diretti contro *target* cerebrali, quali ad es. neuro-recettori, in campioni di sangue provenienti da gruppi di pazienti psichiatrici e tossicodipendenti, caratterizzati clinicamente; 2) Gli effetti immunologici e le eventuali alterazioni neuro-comportamentali prodotti, nel modello animale, dalla immunizzazione con specifici frammenti antigenici di neuro-recettori.

Risultati attesi nel triennio

Ci si propone di valutare una serie di parametri:

1) verificare la presenza di auto-anticorpi contro *target* cerebrali in campioni di plasma provenienti da pazienti affetti da schizofrenia e/o tossicodipendenza, a vari stadi di gravità; analizzare lo spettro di *target* cerebrali verso cui sono diretti gli auto-anticorpi, al fine di identificare uno o più epitopi antigenici, candidati per svolgere un ruolo nel processo auto-immune; sintetizzare frammenti di peptidi che corrispondano a tali epitopi antigenici, per verificare nel modello animale il loro ruolo patogenetico.

2) valutare il potenziale ruolo della eventuale presenza di una componente auto-immune nella eziopatogenesi e/o nella fenomenologia dei comportamenti umani devianti. Tale ruolo sarà investigato in modelli animali validati tramite la induzione di una immunizzazione con frammenti di neuro-recettori. Lo studio dei modelli animali permetterà di caratterizzare le alterazioni del fenotipo comportamentale (es. *craving*) normalmente associate all'abuso di sostanze psicoattive, le alterazioni cognitive, attenzionali e di altri comportamenti di tipo impulsivo, compulsivo e/o presenza di stereotipie. La eventuale induzione di alterazioni comportamentali, associate alla presenza nel sangue di auto-anticorpi diretti contro *target* cerebrali, fornirà preziose informazioni circa il ruolo della auto-immunità nella patogenesi della sintomatologia psichiatrica e della tossicodipendenza.

Trasferibilità dei risultati

Il presente progetto consentirà il rafforzamento negli anni della collaborazione tra l'ISS e gli NIH statunitensi, permettendo lo scambio di studenti e ricercatori. I risultati ottenuti, circa i

determinanti biologici delle manifestazioni di devianza comportamentale, daranno luogo a pubblicazioni scientifiche e saranno divulgati nell'ambito del Convegno "*Risk factors for mental health: translational models for behavioral neuroscience*", proposto in ISS nel 2006. Si attendono ricadute di tipo applicativo, quali lo sviluppo di metodiche diagnostiche per valutare il ruolo delle componenti auto-immunitarie, nell'ambito della patogenesi delle patologie psichiatriche di tipo schizo-affettivo e della tossicodipendenza. Le informazioni prodotte saranno di carattere altamente innovativo, in quanto la eziopatologia psichiatrica è ancora poco nota nella letteratura scientifica.

Improved TSE inactivation

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo (malattia di Creutzfeldt-Jakob, MCJ) e gli animali (scrapie, encefalopatia spongiforme bovina, BSE). Le EST hanno lunghi tempi di incubazione in cui l'infezione non è rilevabile, ma il soggetto può albergare titoli rilevanti dell'agente patogeno (definito prione) in vari distretti corporei. Di conseguenza, numerosi prodotti biologici di origine animale (alimenti e farmaci) e umana (sangue e plasmaderivati) derivanti da soggetti infetti non diagnosticati potrebbero causare la trasmissione dell'infezione sia direttamente che attraverso la contaminazione accidentale di strumenti e superfici con le quali siano venuti a contatto.

L'importanza di una metodica in grado di ridurre l'infettività da prioni in questi materiali deriva dalla particolare resistenza che questi agenti mostrano alle comuni procedure di decontaminazione microbiologica. I prioni possono essere inattivati soltanto utilizzando metodi chimici o fisici estremi che non sono utilizzabili sui prodotti biologici, poiché ne altererebbero irreversibilmente le caratteristiche biochimiche e devono essere usati con attenzione anche sugli oggetti perché altamente corrosivi.

Per cercare di fornire alcune soluzioni a questi problemi abbiamo preso parte ad un consorzio europeo che ha presentato un progetto al sesto programma quadro dell'Unione europea.

Risultati attesi nel triennio

- Mettere a punto saggi biologici per studi di validazione sulle EST umane e animali
- Sviluppare nuovi sistemi di inattivazione per superfici e altri materiali
- Sviluppare tecniche per una rapida rilevazione dell'infettività
- Identificare i metodi che potrebbero rivelarsi utili per migliorare la sicurezza di prodotti a base di carne, di macelli e sottoprodotti di macellazione e che possano essere anche utilizzabili in ambiente ospedaliero.

Migliorare la capacità di rimozione degli agenti delle EST dal sangue.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto è stato stilato in risposta a un bando europeo che aveva come obiettivo lo sviluppo di metodi efficaci per l'inattivazione degli agenti delle EST. Il nostro intento è quello di fornire una serie di informazioni e di procedure che possano trovare immediata applicazione in ambiti di sanità pubblica veterinaria e umana e che diano un contributo significativo per impedire la trasmissione orizzontale dell'infezione.

Interazioni tra i lipidi e i domini di membrana di proteine implicate nei processi di fusione di membrane biologiche

Il processo di fusione tra membrane biologiche è essenziale sia nei processi fisiologici della cellula che nella capacità infettiva di alcune specie virali tra cui i virus influenzali, l'HIV e i paramixovirus. Il principale obiettivo del nostro studio è comprendere il meccanismo di fusione

del virus Sendai, un paramixovirus nel cui involucro lipidico sono inserite le glicoproteine HN e F responsabili del processo di legame e fusione tra il virus e la cellula ospite. Il sistema sul quale sarà condotta l'indagine è costituito dal virus isolato (o dal suo involucro ricostruito) e dalle membrane di eritrociti umani. Mentre molti studi sono stati dedicati alla definizione del ruolo del peptide idrofobico, localizzato nella parte esposta al solvente della proteina di fusione F, poco è noto sul ruolo e la modalità d'azione dei domini di transmembrana della proteina HN che serve a legare il virus ai recettori cellulari. Alcuni studi, tra cui i nostri, hanno mostrato che questa proteina lavora di concerto con la proteina F nel processo di fusione, probabilmente interagendo con la F in maniera transiente. Inoltre alcuni dati indicano che la componente lipidica dell'involucro del virus Sendai e la sua interazione con i domini di transmembrana delle due glicoproteine dell'involucro sono essenziali per il corretto svolgimento del processo di fusione virus-cellula. Pertanto il presente progetto è dedicato alla comprensione di quale ruolo svolgano nel processo di fusione: 1) i domini di transmembrana della proteina HN e della proteina F; 2) la composizione lipidica dell'involucro; 3) le eventuali interazioni specifiche tra i lipidi e le glicoproteine dell'involucro del virus Sendai.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso l'uso e l'attività biologica di peptidi sintetici prodotti a partire dalle sequenze dei domini di transmembrana delle proteine HN e F, si dovrebbe comprendere se le zone proteiche a contatto con i lipidi siano coinvolte nel processo di fusione tra il virus Sendai e la membrana eritrocitaria. Inoltre i dati dovrebbero chiarire la funzione in tale processo della composizione lipidica dell'involucro virale, e in particolare se il colesterolo abbia un ruolo meramente strutturale o se invece abbia delle interazioni specifiche con i domini di transmembrana delle glicoproteine HN e F.

Trasferibilità dei risultati

La comprensione di quali siano e quale ruolo abbiano le componenti implicate nel processo di fusione virus-cellula è importante non solo per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali ma anche per sviluppare sistemi in grado di manipolare il contenuto cellulare in maniera selettiva.

Interferone-alfa e nuovi ligandi sintetici di recettori "Toll-like" come adiuvanti per lo sviluppo di nuove strategie di immunoterapia del cancro

L'identificazione di adiuvanti innocui e allo stesso tempo potenti nello stimolare la risposta immune tumore-specifica rimane un aspetto critico per lo sviluppo di strategie efficaci di immunoterapia del cancro. L'uso di IFN-alfa come adiuvante di vaccini antitumorali è sostenuto da numerosi studi che hanno dimostrato il ruolo cruciale che gli IFN di tipo I svolgono nella regolazione della risposta immune. Il nostro gruppo in particolare ha descritto come l'IFN-alfa promuova la proliferazione/persistenza delle cellule T di memoria in topi con tumore e il differenziamento/attivazione di cellule dendritiche (DC) umane. In anni recenti, è stato dimostrato che i segnali innescati dal legame dei recettori detti "Toll-like" (TLR) con i rispettivi ligandi naturali o con agonisti sintetici portano alla stimolazione dell'immunità innata e adattativa, che può avere effetti terapeutici nei confronti di infezioni e di tumori. Il progetto prevede studi in modelli murini e umani finalizzati a: a) la valutazione del ruolo di IFN di tipo I nel controllo del processo neoplastico; b) la ulteriore caratterizzazione degli effetti di IFN di tipo I sul differenziamento e l'attivazione di DC; c) la valutazione e la caratterizzazione dell'attività immunoregolatoria e antitumorale di nuovi ligandi sintetici di TLR4 e TLR7. Tali studi sono finanziati dall'AIRC (punti a) e b)) e dal Ministero della Salute (punto c) (progetti ricerca finalizzata in collaborazione con IRBM-Merck).

Risultati attesi nel triennio

Definizione del ruolo di IFN di tipo I nella sorveglianza immune contro i tumori: a) nel modello di adenocarcinoma mammario spontaneo in topi transgenici per HER-2/neu e *knock-out* (KO) per il recettore di IFN di tipo I; b) nel modello murino di infezione con MHV-68, analogo alla infezione da EBV che nell'uomo è noto essere associata a neoplasie.

Valutazione del ruolo dell'Interferon Related Factor (IRF)-8 (fattore di trascrizione cruciale per lo sviluppo e la maturazione di DC) nell'induzione mediata da DC di risposte antitumorali da parte di linfociti T, mediante studi in topi KO per IRF-8.

Valutazione della capacità di DC umane differenziate in presenza di IFN-alfa di: a) mediare la "cross-presentazione" di antigeni tumore-associati e il "cross-priming" di linfociti T CD8+ contro antigeni di melanoma; b) di stimolare l'espansione di linfociti T specifici per il nuovo antigene associato al carcinoma del colon-retto COA-1.

Valutazione e caratterizzazione delle proprietà immunoregatorie e dell'attività antitumorale e adiuvante di nuovi ligandi sintetici di TLR4 e TLR7, mediante: a) studio dei loro effetti su DC e linfociti T alfa/beta o gamma/delta umani; b) valutazione della loro attività antitumorale e adiuvante quando somministrati come agenti singoli a topi transgenici per HER-2, oppure insieme a vaccini genetici o peptidici e/o agenti chemioterapici a topi esprimenti entrambi gli antigeni CEA e HER2 umani.

Trasferibilità dei risultati

I risultati attesi degli studi descritti consentiranno di:

acquisire nuove conoscenze su effetti e meccanismi d'azione di IFN di tipo I e di agonisti di TLR4 e TLR7 su cellule dell'immunità innata e acquisita e sulle reciproche interazioni, contribuendo alla definizione di nuovi metodi per la generazione di DC o di linfociti T umani ad elevata attività funzionale;

identificare nuovi ligandi sintetici di TLR4 e TLR7 ad attività antitumorale e adiuvante;

identificare vaccini basati su antigeni tumore-associati umani e combinazioni di vaccini con agenti chemioterapici, ad elevato potenziale immunogenico e terapeutico.

Tali risultati, contribuendo allo sviluppo di nuovi vaccini e farmaci antitumorali e alla definizione di nuove e potenzialmente efficaci strategie per l'immunoterapia del cancro, avranno ricadute positive sia in termini di miglioramento della salute pubblica sia in termini di un più efficiente utilizzo di strumenti terapeutici convenzionali, con un beneficio per il SSN.

Isoprostani come indici e mediatori del danno assonale nella sclerosi multipla

È stato recentemente dimostrato, per mezzo di tecniche innovative di risonanza magnetica in spettroscopia (RMS), che nei soggetti con sclerosi multipla (SM) è presente fin dalle prime fasi della malattia una componente di danno neuronale responsabile della disabilità. Le alterazioni biochimiche evidenziabili con la RMS spesso precedono le lesioni demielinizzanti osservabili con la risonanza convenzionale, fornendo un utile strumento prognostico. Le molecole candidate come indice periferico del danno neuronale, come la 14-3-3, la enolasi-neurone-specifica e la proteina tau, si sono rivelate inadeguate nelle fasi precoci della malattia in quanto, probabilmente, non sufficientemente sensibili o specifiche. Il nostro gruppo studia da tempo dei prodotti di perossidazione lipidica biologicamente attivi, gli isoprostani, riconosciuti come indici sensibili e affidabili di danno ossidativo. Abbiamo in precedenza verificato che i livelli di un particolare tipo di isoprostano sono elevati nel liquor di soggetti con SM e correlati con il grado di disabilità. Ci proponiamo ora di valutare se gli isoprostani presenti nel plasma e nel liquor dei soggetti con SM costituiscano un indice periferico precoce del danno neuronale evidenziato con la RMS, e siano utilizzabili come strumenti prognostici e per monitorare l'efficacia di terapie neuroprotettive. Intendiamo inoltre verificare se gli isoprostani rinvenuti

nel liquor siano mediatori del danno cellulare, valutando la loro attività biologica su oligodendrociti e neuroni in cultura.

Risultati attesi nel triennio

Comprensione di parte dei meccanismi biochimici coinvolti nella patogenesi della SM.

Quantificazione degli isoprostani come strumento prognostico nella SM.

Disponibilità di un nuovo *marker* impiegabile per monitorare l'efficacia di terapie neuroprotettive nei pazienti con SM.

Trasferibilità dei risultati

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

Analogamente, i livelli di isoprostani plasmatici potranno essere utilizzati per monitorare l'efficacia di terapie neuroprotettive nei pazienti con SM.

Italian National Database on Clinical Trials on Rare Diseases

L'accesso alle informazioni relative ai trials clinici sulle malattie rare risulta essere estremamente importante per i ricercatori, per i medici e per i pazienti. L'NIH ha realizzato il database "*ClinicalTrials.gov*", allo scopo di raccogliere le informazioni relative ai trial clinici condotti sulle malattie rare negli USA. Sulla base di questa esperienza il Progetto "*Italian National Database on Clinical Trials on Rare Diseases*" vuole contribuire alla realizzazione di un nuovo database sui trials clinici condotti in Italia sulle malattie rare.

Questo strumento sarà disponibile per a) operatori sanitari, che potranno partecipare in *trials* esistenti o promuoverne nuovi, b) pazienti e associazioni di pazienti, al fine di permetterne e promuoverne l'arruolamento, c) ricercatori.

Il database sarà organizzato in modo tale da raggiungere i seguenti obiettivi: i) facilitare i pazienti e gli operatori sanitari nell'individuazione di *trial* clinici esistenti; ii) supportare l'avvio e lo sviluppo di nuovi *trial*; iii) facilitare la metà-analisi e la revisione sistematica.

Risultati attesi nel triennio

Il database sui trial clinici fornirà informazioni in merito ai protocolli di ricerca e contribuirà a fornire contatti a livello scientifico e a facilitare il pubblico accesso ai *trial* clinici e agli studi in stato di svolgimento.

Trasferibilità dei risultati

Il Progetto permetterà la creazione del registro Nazionale Italiano sui *trial* clinici per le malattie rare, avvalendosi dell'esperienza del database *Clinicaltrials.gov*, in particolare avvalendosi della collaborazione del *National Library of Medicine and the Office for Rare diseases*.

L'acetilcolina nella fisiologia degli oligodendrociti: possibile ruolo nella ri-mielinizzazione nella sclerosi multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è caratterizzata dalla distruzione della guaina mielinica e dalla assenza di una efficace rimielinizzazione degli assoni colpiti. La perdita della componente neuronale è un evento precoce nella malattia e è alla base delle caratteristiche disabilità sensorie e motorie. Benché la comprensione dei meccanismi patologici che portano alla distruzione della mielina sia di primaria importanza ai fini del trattamento della malattia, lo studio dei meccanismi che possono favorire la ri-mielinizzazione, è di grande interesse per sviluppare trattamenti neuro-protettivi. Tra le molecole endogene per le quali si ipotizza un ruolo neuroprotettivo ci sono i neurotrasmettitori e in particolare l'Acetilcolina (ACh). Recenti evidenze indicano che le cellule gliali che formano mielina (cellule di Schwann e

oligodendrociti) esprimono diversi sottotipi recettoriali per l'ACh. Nelle cellule di Schwann, l'attivazione dei recettori muscarinici induce l'arresto del ciclo cellulare e il differenziamento. Alcuni sottotipi recettoriali per l'ACh sono espressi negli oligodendrociti e nei loro precursori, ma le conseguenze funzionali della loro attivazione non è nota. Lo scopo del presente progetto è di studiare l'attività dell'ACh sugli oligodendrociti. In particolare, ci proponiamo di studiare gli effetti di ACh sulla sopravvivenza, la proliferazione e il differenziamento degli oligodendrociti sia in condizioni normali che in condizioni di stress ossidativo.

Risultati attesi nel triennio

Numerose molecole endogene possono svolgere ruoli neuroprotettivi; tra queste ci sono i neurotrasmettitori e, in particolare, l'acetilcolina (ACh). Dati recenti mostrano un effetto protettivo degli inibitori dell'enzima ACh esterasi preposto alla degradazione dell'ACh in modelli animali usati per lo SM, quali la encefalopatia allergica sperimentale. Dati preliminari indicano che alcuni dei sottotipi recettoriali colinergici, sia muscarinici sia nicotinici, sono espressi in oligodendrociti maturi o nei loro progenitori. Inoltre i progenitori degli oligodendrociti possono esprimere l'enzima biosintetico colina acetiltransferasi (ChAT), suggerendo un coinvolgimento del sistema colinergico nel mantenimento funzionale degli oligodendrociti.

I risultati attesi del progetto proposto sono:

- la caratterizzazione dei componenti del sistema colinergico (sottotipi recettoriali ed enzimi coinvolti nella sintesi e degradazione dell'ACh) presenti negli oligodendrociti maturi o nei loro progenitori.
- la caratterizzazione degli effetti dell'ACh su sopravvivenza, proliferazione e differenziamento di progenitori degli oligodendrociti in condizioni normali o sperimentali che replicano fenomeni di stress ossidativo, rilevanti per la patogenesi della SM.

Trasferibilità dei risultati

Sviluppo trattamenti neuro-protettivi che sfruttano la capacità del sistema colinergico di controllare proliferazione e differenziamento degli oligodendrociti, consentendo una efficace rimielinizzazione, salvaguardando l'integrità assonale.

La proteina Nef di HIV-1 nel controllo dell'attività della NADPH ossidasi, enzima chiave nell'immunità innata delle cellule fagocitarie

Le cellule con attività fagocitaria rappresentano la prima linea di difesa contro l'infezione da microrganismi patogeni. Durante la fagocitosi o in seguito a stimoli di varia natura, i macrofagi, come altre cellule fagocitarie, producono alti livelli di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (ROS), in particolare mediante l'attivazione del complesso enzimatico della NADPH ossidasi. Questo processo viene chiamato "*oxidative or respiratory burst*". La NADPH ossidasi catalizza la formazione di superossido ($O_2^{\bullet-}$) da ossigeno molecolare e NADPH, che successivamente viene convertito a perossido di idrogeno, sia per un processo spontaneo di dismutazione che dall'azione dell'enzima superossido dismutasi.

Fluttuazioni transienti dei livelli di ROS servono come importanti regolatori di funzioni cellulari, ma la produzione incontrollata di alti e/o sostenuti livelli di ROS possono indurre una condizione di *stress* ossidativo causando gravi danni a diversi compartimenti cellulari. Alterati livelli di produzione dei ROS sembrano implicati anche in diversi aspetti della patogenesi nell'infezione da HIV-1. È stato infatti osservato che l'HIV-1 è in grado di indurre una riduzione delle funzioni immunitarie delle cellule macrofagiche, esponendo il paziente ad un elevato rischio di infezioni opportunistiche con esito letale.

La proteina Nef di HIV-1 occupa un ruolo primario nella patogenesi e nell'evoluzione dell'AIDS. Questo progetto di ricerca intende studiare il ruolo che Nef potrebbe svolgere nel

modulare i livelli di produzione dei ROS e in particolare nel regolare l'attività del complesso enzimatico NADPH ossidasi.

Risultati attesi nel triennio

Risultati preliminari hanno indicato che Nef è in grado di controllare l'attività dell'enzima NADPH ossidasi con una cinetica bimodale, inducendo sia un'attivazione che un'inibizione dell'attività della NADPH ossidasi. Inoltre abbiamo determinato che l'azione inibitoria di Nef è mediata, almeno in parte, dall'induzione di interleukina-10.

Gli obiettivi di maggiore interesse del progetto che ci proponiamo di raggiungere possono essere così sintetizzati:

- Valutazione degli effetti di Nef sulla fosforilazione delle subunità citosoliche della NADPH ossidasi (p47phox, p67phox and p40phox) e loro traslocazione sulla membrana cellulare.
- Analisi del ruolo della tirosina-chinasi Hck e della proteina-chinasi A cAMP-dipendente (PKA) nel modulare gli effetti, sia attivatori che inibitori, di Nef.
- Studio del contributo funzionale dei microdomini lipidici di membrana (*lipid rafts*) nella regolazione degli eventi di traduzione del segnale coinvolti nell'inibizione della NADPH ossidasi mediata da Nef.
- Valutazione dell'effetto di Nef e dei suoi mutanti su altre funzioni specializzate dei monociti/macrofagi come l'espressione di recettori specifici che mediano la fagocitosi e il *burst* ossidativo, i.e. *Fcg receptors*, *toll-like receptors*, *complement receptors*;
- Valutazione dell'effetto dell'HIV-1 sulle funzioni specializzate dei monociti/macrofagi in esperimenti di infezione con il virus *wild type*, con virus esprimenti mutanti funzionali di Nef o con virus deleti per il gene nef;
- Realizzazione di un modello sperimentale *in vitro* che permetta l'identificazione di inibitori specifici di Nef e/o di trattamenti di tipo farmacologico in grado di controbilanciare l'effetto di Nef.

Trasferibilità dei risultati

L'infezione da HIV-1 determina una riduzione delle attività funzionali delle cellule fagocitarie, che favorirebbe la riattivazione e lo sviluppo delle infezioni opportunistiche durante la progressione dell'AIDS. Esperimenti condotti nel nostro laboratorio suggeriscono che la proteina Nef di HIV-1 potrebbe inibire la produzione di anione superossido da parte della NADPH ossidasi, enzima coinvolto nel *burst* ossidativo delle cellule fagocitarie. Il nostro obiettivo sarà di chiarire alcuni dei meccanismi molecolari coinvolti nell'alterazione della risposta immunitaria cellulo-mediata. Riteniamo che questi risultati possano contribuire all'elaborazione di nuove strategie terapeutiche per migliorare la risposta immunitaria dei pazienti affetti da AIDS. In ambito biotecnologico pensiamo di realizzare un modello sperimentale *in vitro* basato sui cloni U937 stabilmente trasfettati con i vettori d'espressione inducibili contenenti Nef, che permetta l'identificazione e la valutazione di agenti farmacologici in grado di riattivare la NADPH ossidasi, sia mediante un'azione antagonista che per diretta inibizione della proteina Nef.

Manipolazione delle cellule dendritiche mediante la tecnologia degli RNA interferenti per protocolli di immunoterapia del cancro.

Questa ricerca si propone di sfruttare la capacità degli RNA interferenti di modulare ("silenziare") l'espressione genica in maniera altamente specifica per generare cellule dendritiche (DC) più efficaci nell'indurre e mantenere una risposta immunitaria verso antigeni associati a tumori (TAAs) mediata da cellule T effettrici.

Per raggiungere tale obiettivo, i geni candidati allo specifico “silenzamento” (la subunità del recettore dell’IL-10 specifica per il ligando [IL-10R1], il fattore trascrizionale STAT-3, e i recettori inibitori ILT3 and ILT4) sono stati selezionati sulla base della nostra ipotesi di lavoro che alterando i processi che portano alla “tolleranza” cellulare si potrebbero generare DC capaci di stimolare una risposta immunitaria più efficace verso i tumori.

Il progetto sarà articolato nei seguenti obiettivi:

- Sviluppo di sistemi di espressione degli RNA interferenti per permettere la soppressione dell’espressione di geni da noi selezionati in modo controllato, specifico e altamente efficace. In particolare verranno utilizzati RNA interferenti sia chimicamente sintetizzati (siRNA) e trasfettati transientemente nelle DC, che espressi endogenamente mediante l’infezione delle DC con appropriati vettori lentivirali contenenti cassette di espressione degli RNA interferenti.
- Valutazione delle possibili conseguenze fenotipiche e funzionali del silenziamento di specifici geni in DC.
- Valutazione delle capacità delle DC “silenziate” di processare e presentare i TAAs.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nell’ambito di questo progetto forniranno 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.

Trasferibilità dei risultati

A lungo termine, questi risultati dovrebbero fornire informazioni utili per la generazione di nuovi tipi di DC, più efficienti nell’indurre una risposta immunitaria nei pazienti malati di cancro, permettendo così di trasferire un approccio di ricerca di base in nuove prospettive cliniche.

Marcatori redox del sangue periferico nelle patologie respiratorie dell’uomo: valutazioni biochimiche e fisiopatologiche

La Broncopneumopatia Cronico Ostruttiva (BPCO) rappresenta la quinta causa di ospedalizzazione in Italia e nel mondo. È essenzialmente una patologia dell’anziano spesso caratterizzata da una significativa invalidità di cui si conoscono solo parzialmente la patogenesi e i *marker* prognostici di progressione. La BPCO è considerata una malattia respiratoria in cui la presenza di radicali e specie reattive dell’ossigeno e dell’azoto è determinante. In particolare, sia al livello plasmatico che a livello di elementi cellulari del sangue periferico sono state riscontrate alterazioni redox che a loro volta determinano modificazioni cellulari e plasmatiche rilevanti. Il presente progetto, basato su dati da noi pubblicati negli ultimi anni, verrà portato avanti in collaborazione con un gruppo di clinici dell’ospedale Forlanini di Roma e si propone di studiare in pazienti BPCO e in controlli *age-matche* la correlazione tra parametri biochimici del sangue periferico, i vari stadi della malattia e l’effetto della terapia. Inoltre, in collaborazione con il Dr. T. Leto (NAID/NIH) e in linea con gli studi da lui effettuati sulle varie isoforme di NAD(P)H ossidasi I (o Nox I) dei tessuti, verranno analizzate l’attività, le isoforme di Nox I e la loro modificazione in corso di malattie respiratorie, di asma e BPCO. Il cosiddetto “*burst* ossidativo” da parte di neutrofili svolge un ruolo centrale nella induzione dello *stress* alveolare e della susseguente broncopneumopatia e broncospasmo e verosimilmente si riflette nell’alterazione di determinanti cellulari e plasmatiche.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono: a) valutazione dei parametri clinici generali prima e dopo terapia con farmaci antiossidanti (parametri reologici, funzionali ecc.); b) valutazione dello stato di *stress* ossidativo mediante tecniche di risonanza di *spin* elettronico; c) 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 d) *markers* di progressione della malattia con possibilità di impiego clinico.

Trasferibilità dei risultati

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

Messa a punto di metodologie di Risonanza Magnetica (MR) *in vivo* per il monitoraggio del pH tumorale in relazione alla risposta terapeutica

Alcuni meccanismi della resistenza tumorale agli agenti citotossici può essere causata da una aumentata acidificazione dei compartimenti extracellulari. Si è visto che gli inibitori delle pompe protoniche possono inibire l'acidificazione dell'ambiente extracellulare tumorale e aumentare la sensibilità delle cellule tumorali agli agenti citotossici. La spettroscopia MR è una tecnica non invasiva che consente di misurare il pH extracellulare *in vivo* all'interno di distretti corporei.

Questo progetto, condotto presso il Reparto di *Imaging* Molecolare e cellulare in collaborazione con il Reparto di Farmacogenetica, Farmacoresistenza e Terapie Sperimentali (Dipartimento del Farmaco) si propone di studiare 1) su cellule tumorali alterazioni del pH intracellulare e extracellulare in relazione alla proliferazione cellulare, condizioni di ipossia e al silenziamento di componenti proteici rilevanti ai fini del metabolismo e 2) in modelli animali (*xenograft* di tumori umani in topi SCID) la relazione tra pH extracellulare e necrosi, istotipo tumorale, grado di invasività, capacità metastatica, *l'uptake* ed efficacia di farmaci antitumorali.

Risultati attesi nel triennio

Si useranno inibitori delle pompe protoniche (ad esempio omeprazolo) su modelli di melanoma in topi SCID con l'obiettivo di estendere le analisi ad altri tumori. Si utilizzeranno sonde per la rivelazione del pH *in vivo* con la spettroscopia MR del fosforo (³¹P), del fluoro (¹⁹F) e dell'idrogeno (¹H). In particolare con la spettroscopia del fluoro sarà possibile seguire *l'uptake* di farmaci fluorurati simultaneamente alla misura di pH extracellulare. L'uso delle sonde del fosforo consentirà di seguire nello stesso tempo lo stato bioenergetico del tumore, il pH intracellulare e extracellulare. La grande sensibilità che si ha con la spettroscopia di protone consentirà invece di studiare l'eterogeneità del pH all'interno di diverse aree tumorali attraverso la realizzazione di mappe di pH all'interno del tumore.

Si ritiene inoltre di poter correlare l'efficacia del trattamento con inibitori delle pompe protoniche con il pH tumorale. L'estensione della spettroscopia MR sia ad altri istotipi tumorali sia a tumori con vario grado di malignità permetterà di verificare l'attendibilità di tale metodica nel consentire di predire la risposta al trattamento con inibitori delle pompe protoniche in base al pH del tumore prima del trattamento. In modelli metastatici si spera anche di poter individuare le metastasi rispetto a variazioni di pH della lesione metastatica rispetto al tessuto sano circostante.

Trasferibilità dei risultati

I metodi e i protocolli di misura proposti in questa ricerca e validati su modelli preclinici, finalizzati a valutare le potenzialità della spettroscopia MR *in vivo* per la determinazione del pH di lesioni tumorali in relazione alla progressione neoplastica e alla risposta alla terapia, potrebbero avere una importante ricaduta a livello clinico anche alla luce di *trials* di prossima

attivazione in pazienti affetti da tumori maligni. L'introduzione di tale metodica non invasiva nel *follow up* dei pazienti con tumore potrà rappresentare un nuovo e valido strumento nelle mani degli oncologi clinici. Infatti, si prevede che i risultati di questo progetto, ottenuti su modelli pre-clinici *in vitro* e *in vivo*, possano contribuire a superare i problemi legati ad *uptake* di farmaci, polichemiesistenza e risposta al trattamento sulla base di alterazioni di pH tumorale.

Modulazione della risposta infiammatoria nella microglia ad opera del sistema acetilcolina/recettore nicotinico alfa 7

Nel SNC, i recettori colinergici-nicotinici sono coinvolti nel controllo di importanti funzioni vegetative e in attività più strettamente correlate al comportamento e alle funzioni cerebrali superiori, quali memoria e apprendimento. L'espressione di recettori nicotinici in popolazioni cellulari non neuronali del SNC e del sistema immune innato, suggerisce che il sistema colinergico possa svolgere un ruolo alternativo alla neurotrasmissione. Di particolare interesse è la recente descrizione della cosiddetta "via colinergica anti-infiammatoria" mediata da recettori nicotinici di tipo alfa 7 che, espressi in macrofagi periferici, sono in grado di mediare la deattivazione macrofagica, inibendo il rilascio di molecole pro-infiammatorie. Studi condotti nel nostro laboratorio, nell'ambito di un progetto precedentemente finanziato, hanno dimostrato l'espressione del recettore alfa 7 anche in colture purificate di microglia di ratto. L'attivazione del recettore alfa 7 con nicotina inibiva il rilascio di molecole pro-infiammatorie quali NO e TNF alfa mentre promuoveva la sintesi di PGE2, un mediatore lipidico in grado di modulare numerose funzioni microgliali, suggerendo l'esistenza di una via colinergica anti-infiammatoria mediata dal recettore alfa 7 a livello cerebrale.

Stiamo attualmente approfondendo lo studio dei meccanismi di modulazione delle funzioni microgliali mediate da alfa 7 sia *in vitro*, sia in un modello animale di ipofunzionalità del sistema colinergico centrale.

Risultati attesi nel triennio

Studi *in vitro*: Poiché numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la nicotina espleti alcune funzioni neuroprotettive inducendo la sintesi di fattori neurotrofici, quali NGF e BDNF, intendiamo analizzare gli effetti della stimolazione colinergica sulla sintesi e rilascio di tali fattori da parte della microglia attivata. Inoltre, ci proponiamo di identificare i meccanismi di trasduzione del segnale evocati dalla stimolazione del recettore alfa 7. In particolare, intendiamo analizzare il ruolo di alcune chinasi e fattori di trascrizione coinvolti nella modulazione delle funzioni microgliali.

Studi *in vivo*: In collaborazione con la Dott.ssa L. Ricceri, analizzeremo gli effetti a medio e lungo termine sull'attivazione microgliale di una deplezione del sistema colinergico centrale. Come modello animale di ipofunzionalità colinergica useremo ratti lesionati dopo la prima settimana di vita con l'immunotossina IgG192-Saporina, in grado di danneggiare selettivamente le popolazioni neuronali colinergiche. Animali lesionati e di controllo verranno poi trattati con stimoli pro-infiammatori di varia natura (endotossina batterica e citochine), a diversi tempi dalla lesione.

Ciò permetterà di caratterizzare lo stato di attivazione microgliale in assenza dell'ipotizzato meccanismo endogeno di controllo delle funzioni di tali cellule e di valutare l'esistenza di eventuali meccanismi che possano intervenire a compensare, a lungo termine, la mancanza del sistema regolatorio colinergico.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione della "via colinergica anti-infiammatoria" cerebrale permetterà di ampliare la conoscenza dei fenomeni di interazione neuroni-glia e dei processi infiammatori del

SNC, la cui comprensione è, a tutt'oggi, limitata. Ciò consentirà lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate alla manipolazione delle risposte microgliali in condizioni patologiche acute e croniche, in cui una de-regolata ed eccessiva attivazione microgliale è ritenuta responsabile dell'esacerbazione del danno neuronale.

Monitoraggio non-invasivo mediante risonanza magnetica di meccanismi patogenetici in malattie del SNC

Le odierne tecniche di risonanza magnetica (RM) ad alto campo oggi rappresentano potenti strumenti di diagnosi e monitoraggio non-invasivo della evoluzione di patologie del SNC a livello clinico. Tuttavia, nonostante i recenti progressi, esistono ancora limitazioni nello sviluppo delle potenzialità della RM 1) nella diagnosi e nel monitoraggio della progressione di malattie associate alla formazione di depositi proteici intracerebrali quali placche di beta-amiloide nella malattia di Alzheimer e depositi di prione patologico nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE); 2) nella identificazione degli effetti di trattamenti terapeutici di tipo innovativo e convenzionale su tumori del SNC.

Questo Progetto, condotto presso il Reparto di *Imaging* Molecolare e Cellulare (IMC), si propone di 1) valutare le possibilità applicative della RM nel monitorare *in vivo* i processi patogenetici associati a TSE e a malattia di Alzheimer; 2) valutare l'efficacia di nuovi agenti anti-tumorali in modelli di glioma e meuloblastoma.

Risultati attesi nel triennio

1) Malattie neurodegenerative: a) identificazione e valutazione mediante RM dell'evoluzione di malattia in roditori, a seguito di infezione con agenti di TSE animale (ad es. Scrapie) o umana (vCJD), al fine di identificare possibili indicatori precoci di patologia, prima dell'insorgenza dei sintomi; b) progettazione, sintesi e valutazione, mediante RM e tecniche immunoistochimiche di agenti di contrasto per la rivelazione *in vivo* di placche amiloidi in modelli murini di Alzheimer e di depositi prionici in modelli di TSE. A tale scopo, in collaborazione con il Reparto di Farmacologia Molecolare e Cellulare, il Reparto ICM si propone di realizzare e valutare nuovi biomarcatori fluorurati e agenti di contrasto coniugati con gadolinio, per la rivelazione selettiva di depositi proteici patologici mediante imaging del ^{19}F e del protone, su modelli animali sviluppati dal Reparto di Malattie Neurologiche, Degenerative e Infiammatorie.

2) Tumori cerebrali: con l'impiego di metodi MRI/MRS sarà monitorata la crescita di tumori cerebrali ad attività antitumorale di nuova applicazione (inibitori di recettori metabotropici del glutammato (mGlu2/3)).

Trasferibilità dei risultati

La valutazione in animali sperimentali di metodi di *imaging* non invasivo per il monitoraggio longitudinale mediante MRI della progressione *in vivo* e *in situ* di malattie da prioni animali e umane rappresenta le basi per il possibile sviluppo di modelli pre-clinici adatti a valutare l'efficacia di eventuali protocolli terapeutici.

La realizzazione e la valutazione su modelli pre-clinici di agenti di contrasto specifici per depositi proteici nel SNC rappresenterebbero una svolta nella diagnostica radiologica della malattia di Alzheimer o di patologie prioniche, e contribuirebbero in misura rilevante alle conoscenze dei meccanismi patogenetici di queste malattie neurodegenerative.

Lo sviluppo di metodi MRI/MRS per la diagnostica e il monitoraggio di terapie antitumorali in modelli di tumori cerebrali rappresenta un utile strumento sia per la valutazione dell'effetto di nuovi farmaci, che per il trasferimento di nuovi protocolli nella clinica.

Multi-National External Quality Assay (EQA) programmes in Clinical Molecular Diagnostic based on Performance and Interpretation of PCR assay methods including dissemination and training (EQUAL)

EQUAL è un progetto finanziato dalla Commissione europea che coinvolge otto *Partners* tra cui figura l'ISS.

Il Progetto, coordinato dal Prof. Pazzagli - Università di Firenze, è basato su attività di Controllo Esterno di Qualità (CEQ) in PCR qualitativa, quantitativa e sequenziamento, al fine di migliorare la qualità nell'uso delle metodologie nei laboratori di diagnostica molecolare. A tale scopo, il progetto è stato articolato in quattro fasi. La prima fase è consistita nell'organizzazione di un *network* Europeo dei coordinatori dei Programmi di CEQ sia metodologici che specifici per le patologie. Sono stati quindi realizzati i tre CEQ in PCR qualitativa, quantitativa e sequenziamento. Successivamente sono stati individuati i partecipanti a cui è stato proposto il programma del Progetto. La terza fase è consistita nell'organizzazione di sei corsi teorico-pratici in diversi Paesi Europei, tra cui l'Italia, per la revisione di competenze tecniche e interpretative richieste per l'uso corretto di *test* nella diagnostica molecolare. Infine, è stata eseguita una analisi dei risultati raccolti durante il Progetto. Per le attività future, la nostra Unità utilizzerà come modello di studio il *test* per la diagnosi molecolare di beta-talassemia.

Risultati attesi nel triennio

Miglioramento della qualità dei laboratori di diagnostica molecolare.

Trasferibilità dei risultati

Standardizzazione di protocolli nella diagnostica molecolare

Raccomandazioni e linee guida per un sistema di assicurazione di qualità per i laboratori di diagnostica molecolare

Pubblicazione su riviste internazionali dei risultati ottenuti.

Network of Public Health Institutions on Rare Diseases (NEPHIRD)

Una delle "aree prioritarie" individuate dalla Commissione Europea nel programma di "Community action in the field of Public Health" è la sorveglianza delle malattie rare (MR).

NEPHIRD è un progetto finanziato dalla Commissione europea, coordinato dall'ISS.

Il numero esiguo di persone affette da MR e la numerosità di queste malattie richiede di rafforzare la collaborazione fra i diversi Paesi EU affinché realizzino un sforzo concertato per affrontare i problemi delle MR. NEPHIRD è un *network*, cui collaborano 15 Paesi, organizzato con lo scopo di coordinare questi sforzi.

In particolare, NEPHIRD ha i seguenti obiettivi: a) la raccolta di dati epidemiologici (frequenze e distribuzione) di specifiche MR selezionate come modelli rappresentativi di categorie più ampie (alcune MR metaboliche, sindromi di Rett, Prader Willi, Cornelia de Lange, difetti per riduzione degli arti, neurofibromatosi); b) studi sulla qualità di vita delle persone che sono affette da queste patologie; c) studi sulla qualità di assistenza sanitaria prestata ai pazienti; d) elaborazione degli indicatori di sanità pubblica nell'ambito di queste patologie rare.

NEPHIRD quindi intende aumentare le conoscenze per una migliore programmazione dei servizi sanitari, considerando sia l'accesso sia la qualità, soprattutto mediante la comprensione dei bisogni dei pazienti. In tal senso, intende contribuire a sviluppare l'epidemiologia dei bisogni, da considerarsi complementare all'epidemiologia delle malattie.

Risultati attesi nel triennio

stima a livello europeo della prevalenza/incidenza e distribuzione geografica di patologie selezionate come modelli (malattie metaboliche rare, le sindromi di Rett, Prader Willi, Cornelia de Lange, difetti per riduzione degli arti, neurofibromatosi)

Stime epidemiologicamente valide di indicatori di qualità di vita e accessibilità ai servizi socio-sanitari.

Elaborazione di un modello di *network* per la raccolta efficiente e standardizzata dei dati a livello europeo.

Articoli scientifici

Preparazione e gestione di un sito *web* dedicato per diffondere le informazioni e conoscenze delle attività del *Network* (www.cnmr.iss.it Vedi NEPHIRD).

Trasferibilità dei risultati

I risultati contribuiranno ad individuare le priorità per gli interventi di sanità pubblica per le malattie rare a livello europeo, in primo luogo una migliore pianificazione dei servizi sanitari. I vari indicatori elaborati dal progetto possono essere utilizzati e adottati da diverse strutture epidemiologiche a livello europeo per ottimizzare e armonizzare le proprie attività anche a livello nazionale e regionale.

Plasticità sinaptica e riparazione del danno cerebrale

Le cellule gliali svolgono un ruolo di primaria importanza nel mantenimento della funzionalità del sistema nervoso centrale (SNC), non solo attraverso un'azione di supporto strutturale o trofico, ma anche influenzando la sinaptogenesi, il mantenimento dell'attività sinaptica e la sua plasticità. Più controverso appare il possibile ruolo della glia nei processi di recupero funzionale in risposta a insulti sia acuti che cronici.

Le cellule microgliali rappresentano la principale popolazione macrofagica del SNC e sono importanti cellule effettrici nei processi infiammatori e immunitari del SNC. La loro attivazione è fondamentale per la risoluzione dell'evento patologico. Tuttavia il perdurare della reazione microgliale può contribuire al danno cellulare. Alcuni studi indicano che i macrofagi possono contribuire all'induzione di "sprouting" assonale e genericamente condizionare la natura "non permissiva" del SNC. D'altra parte la gliosi astrocitaria, alla cui formazione la microglia contribuisce, di per sé gioca un ruolo inibitorio sulla rigenerazione neuronale.

Questo studio, attraverso l'utilizzo di paradigmi sperimentali che riproducono *in vitro* alcuni degli aspetti della patologia acuta o cronica, intende analizzare l'effetto diretto della microglia sulla sopravvivenza e funzionalità del neurone e delle altre componenti gliali quali astrociti e oligodendrociti.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono:

- caratterizzazione del ruolo dell'astroglia nello stabilirsi e nel mantenimento della funzionalità neuronale.
- caratterizzazione del ruolo delle diverse componenti gliali (astrociti e microglia) in vari stati funzionali, nella protezione e recupero della funzionalità neuronale
- caratterizzazione degli effetti della microglia sulla sopravvivenza e differenziamento degli oligodendrociti, necessari alla corretta conduzione del segnale elettrico.

La disponibilità di colture purificate di cellule gliali (microglia, astrociti e oligodendrociti) e neuronali (neuroni ippocapali e granuli cerebellari), correntemente utilizzate nel nostro laboratorio ci consentirà di allestire modelli sperimentali riproducenti aspetti specifici di neuropatologie acute (ipossia, eccitotossicità, infiammazione) o croniche (esposizione a proteine amiloidee).

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di meccanismi molecolari attraverso i quali la microglia può influenzare il ripristino della funzionalità del tessuto cerebrale agendo sia attraverso le altre cellule gliali (astrociti e oligodendrociti), sia direttamente sui neuroni potrebbe consentire nuove strategie terapeutiche per il recupero funzionale dopo danno cerebrale.

Produzione *in vitro* di cellule umane primarie a scopo terapeutico e diagnostico

Nel corso di studi multidisciplinari per lo studio del controllo dei processi di differenziamento e proliferazione della cellula staminale emopoietica abbiamo:

- a) dimostrato che, in presenza di glucocorticoidi e di estrogeni, cellule purificate CD34+ o mononucleate dal sangue periferico di soggetti normali o talassemici danno origine ad una popolazione omogenea di eritroblasti immaturi *in vitro* che possono essere indotti a differenziare in cellule mature.
- b) caratterizzato il ruolo del fattore di trascrizione nucleare GATA-1 nei processi di differenziamento e maturazione dei megacariociti, eritroblasti e mastociti;
- c) caratterizzato una nuova linea cellulare dipendente dalla trombopoietina per la sopravvivenza e proliferazione.

Intendiamo perseguire i seguenti obiettivi:

- a) Identificazione dei fattori nucleari che regolano i geni globinici;
- b) Caratterizzare i meccanismi di regolazione dei recettori per i glucocorticoidi e gli estrogeni e la loro funzione e regolazione in associazione con i recettori emopoietici;
- c) Proseguire nella caratterizzazione dei sistemi di coltura di cellule primarie.

Risultati attesi nel triennio

Dallo svolgimento di queste attività di ricerca ci aspettiamo di ottenere:

- lo sviluppo di condizioni di coltura su larga scala che permettano l'espansione di eritroblasti primari umani,
- la caratterizzazione del ruolo dei fattori di crescita e dei glucocorticoidi nel differenziamento eritroide,
- la caratterizzazione dei meccanismi cellulari e molecolari della regolazione dei geni globinici mediante agenti farmacologici o fattori nucleari,
- la caratterizzazione della mielofibrosi indotta da ridotti livelli di espressione del gene GATA-1 in topi transgenici;
- la caratterizzazione del differenziamento megacariocitario.

Trasferibilità dei risultati

L'attività pregressa oltre alla pubblicazioni di numerosi articoli su riviste scientifiche internazionali e di linee guida per la sperimentazione clinica, ha portato alla presentazione di due richieste di brevetto di cui una già assegnata positivamente sui terreni di coltura per cellule primarie.

Ci attendiamo che queste attività portino non solo a pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali ma anche alla formazione di altri prodotti brevettabili.

Inoltre le informazioni ottenute sui meccanismi di formazione e sviluppo della mielofibrosi nel modello murino permetteranno di mettere a punto *test* predittivi e ipotesi di terapia della mielofibrosi idiopatica umana.

Progetto ISS-NIH: Nuove strategie molecolari per monitorare e predire la risposta agli interferoni

Questo progetto è finalizzato allo sviluppo di nuove strategie basate sull'uso dei *microarrays* per l'identificazione di pannelli di geni e *pattern* molecolari in grado di monitorare o predire la risposta clinica all'interferone (IFN). La collaborazione nasce da una consolidata esperienza complementare del gruppo del Dr. Belardelli all' ISS sui meccanismi di azione di IFN e del Dr. Marincola all'NIH sullo sviluppo di tecnologie *microarrays*. IFN-alfa è la citochina più utilizzata in clinica. Sebbene studi recenti abbiano evidenziato le sue proprietà immunostimolatorie, il meccanismo di azione *in vivo* è ancora oscuro, così come ignote sono le cause della scarsa risposta di alcuni individui e le ragioni dell'esistenza di diversi sottotipi di

IFN-alfa. Nell'ambito di questo progetto, abbiamo condotto studi in collaborazione basati sull'analisi di profili di espressione genica in cellule del sangue periferico (PBMC) di pazienti trattati con IFN, identificando un pannello di geni la cui espressione è consistentemente aumentata dopo il trattamento con la citochina. Inoltre, sono stati avviati studi *in vitro* su monociti umani trattati con alcuni sottotipi di IFN-alfa. Le nuove tecnologie *microarray* per lo studio dei profili di espressione genica e di proteomica permettono oggi un approccio globale particolarmente utile per l'individuazione di marcatori molecolari predittivi della risposta all'IFN e di terapie personalizzate per soggetti scarsamente responsivi.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di identificare pannelli di espressione di geni e *pattern* molecolari in grado di monitorare e predire la risposta al trattamento con IFN, in modo da disegnare protocolli di terapia più personalizzati ed efficaci con questa citochina. Per l'esecuzione di parte delle ricerche, il progetto si baserà sull'analisi di campioni di PBMC da pazienti con melanoma e soggetti sani, nell'ambito di studi clinici coordinati dal gruppo dell'ISS. Il progetto ha anche lo scopo di verificare l'esistenza di possibili divergenze negli effetti esercitati dai diversi sottotipi di IFN-alfa sulle cellule del sistema immunitario, utilizzando monociti isolati dal sangue periferico da diversi tipi di donatori sani (cinesi, caucasici e afro-americani). Gli obiettivi specifici della sperimentazione *in vitro* consistono nel valutare eventuali differenze nel profilo di espressione genica indotto da diversi sottotipi di IFN-alfa in associazione al profilo di fattori solubili presenti nei sovrantanti di coltura. Infine, utilizzando aliquote di DNA dai campioni clinici e da cellule dei donatori verrà valutata la presenza di eventuali polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei geni del recettore di IFN-1 e di altre citochine. Tale analisi verrà effettuata utilizzando una piattaforma per lo studio degli SNP presenti nelle sequenze codificanti citochine e recettori di citochine sviluppata in collaborazione tra i due laboratori.

Trasferibilità dei risultati

Lo svolgimento del progetto permetterà di individuare nuove piattaforme e strategie per monitorare e predire la risposta all'IFN e per il disegno di protocolli più efficaci e potenzialmente personalizzati di terapia con queste citochine. Nella fase finale, le informazioni ottenute saranno valutate in modo comprensivo, per documentare eventuali correlazioni tra l'assetto genetico di un individuo e gli effetti dei diversi sottotipi di IFN-alfa sul profilo trascrizionale e la capacità di produrre fattori solubili da parte di cellule del sistema immune. I risultati di questo studio forniranno indicazioni trasferibili all'uso clinico dell'IFN-alfa. L'emergere di nuove evidenze sul ruolo non ridondante dei sottotipi di IFN-alfa stimolerà lo sviluppo di studi clinici miranti ad individuare terapie con molecole specifiche più adatte a diverse condizioni fisiopatologiche. L'utilizzo di donatori di razza afroamericana come modello di scarsa responsività alla terapia con IFN-alfa farà luce sui meccanismi, permettendo di individuare sottotipi di IFN-alfa potenzialmente più efficaci in tali soggetti. Infine, la scoperta di SNP funzionali nei geni del recettore di IFN-alfa/beta o di altre citochine, in grado di influenzare potenzialmente la risposta all'IFN stesso, sarà successivamente validata nel contesto di studi clinici più ampi, permettendo il disegno di protocolli di terapie più efficaci e personalizzate sulla base dell'assetto genetico dei singoli soggetti.

Progetto speciale del reparto di neuroscienze comportamentali etologia applicata e benessere animale

Sulla base dell'esperienza acquisita nel campo del benessere animale da membri del Reparto in iniziative nazionali e nel progetto europeo "*Animalsee*", (www.inemm.cnr.it/animalsee.html), scopo del progetto è applicare i concetti metodologici e etici propri della sperimentazione

biomedica agli animali da reddito e da compagnia. Per quanto riguarda gli animali da reddito, rispettando le caratteristiche specie-specifiche, È possibile coniugare il benessere psicofisico con attività produttiva in contesto artificiale e gli aspetti bioetici, questi ultimi di crescente rilevanza per il consumatore europeo. Nel caso degli animali da compagnia, per esempio per quanto riguarda il cane, temi rilevanti sono gli eventi fatali che coinvolgono bambini e anziani, e quindi il problema dei “cani morsiatori”, così come il randagismo. Oppure, per i gatti, la presenza di gatti abbandonati nelle città, con relativi problemi quali le così dette “gattare” e la castrazione dei gatti selvatici. Infine, questo progetto valuterà la possibilità di coniugare aspetti etici con esigenze proprie della sperimentazione e dell’allevamento intensivo. Per esempio, studi nel campo delle Neuroscienze dimostrano sempre più che animali che si sviluppano e vivono in un ambiente arricchito, risposta a un’esigenza di tipo etico, forniscono dati scientificamente più validi. Nel caso dell’allevamento intensivo, a una migliore qualità della vita dell’animale da reddito corrisponderebbe un prodotto migliore e più sano.

Risultati attesi nel triennio

Continuare il lavoro teorico, metodologico e sperimentale (indispensabile per la stesura di pareri per le pratiche di autorizzazione in deroga, su richiesta del Min.Sal., secondo il DL 116-1992, e la revisione di normative), sulla sperimentazione biomedica, in particolare roditori e primati;

Contribuire all’identificazione di parametri comportamentali e fisiologici per una visione integrata e multidisciplinare del livello di benessere;

Offrire un contributo sia teorico che metodologico al problema del trasporto degli animali da reddito per ovviare a condizioni stressanti quali es. salita/discesa dal veicolo, isolamento/raggruppamento sociale inappropriato, etc;

Incrementare lo scambio di informazioni e spunti sia teorici che metodologici tra i tre contesti identificati (animali da laboratorio, animali da allevamento, animali da compagnia), attingendo all’esperienza etologica, alla discussione di problemi importanti quali il randagismo e l’esistenza di razze canine giudicate pericolose.

Avviare una analisi, basata su dati scientifici e considerazioni bioetiche, sui possibili sviluppi della “*pet therapy*”, compresi gli aspetti che riguardano la formazione di personale specializzato.

Trasferibilità dei risultati

Le attività sopra menzionate daranno luogo a pubblicazioni sperimentali e teoriche, e alla partecipazione a convegni e *workshop*. Sarà organizzato un Corso in ISS “Uomini e animali, differenti contesti e modalità di interazione: aspetti applicativi e normativi”, offrendo a operatori del SSN e del mondo accademico e della ricerca una maggiore conoscenza riguardo i differenti contesti dell’interazione uomo-animali; permettendo loro di essere in grado di valutare i vantaggi e gli svantaggi derivanti da tale interazione; di avere una maggiore conoscenza e essere aggiornati riguardo alle normative nazionali e internazionali che regolano il rapporto uomo-animali; di poter trasmettere le nozioni acquisite e contribuire a un rapporto meno problematico e più equilibrato tra la specie umana e le specie non-umane. Infine, tutte le attività qui menzionate verranno riportate sul sito “Etologia applicata” del Dipartimento BCN. <http://www.iss.it/aree/biol/index.html>

Registro Nazionale Farmaci Orfani

Il Registro Nazionale dei Farmaci Orfani (RNFO) è stato istituito all’Istituto Superiore di Sanità (ISS) nel 2004 (GU 23-25/11/2004); il flusso informativo dai Centri identificati dalle Regioni per la diagnosi e l’erogazione dei farmaci è reso obbligatorio in quanto legato alla rimborsabilità del farmaco da parte del SSN alle Regioni. I dati raccolti dal RNFO,

funzionalmente collegato con il Registro Nazionale Malattie Rare (RNMR), potranno costituire la base per realizzare studi clinici sui farmaci orfani sul territorio nazionale.

L'ISS è, inoltre, sede del RMNR (DM 279/2001) che costituisce il punto di convergenza nazionale del flusso epidemiologico sulle malattie rare diagnosticate nei centri regionali. Ad oggi, sono presenti nel RNMR oltre 600 malattie rare distribuite sul territorio nazionale.

La bassa prevalenza delle malattie rare spiega l'esigua evidenza scientifica disponibile sulle malattie stesse e sulle possibili terapie; su questa base l'EMA ha definito l'iter per la registrazione dei farmaci orfani (FO). Pertanto, gli studi di fase IV e i dati della post *marketing surveillance* (PMS) sono indispensabili per misurare l'efficacia e la sicurezza dei FO; è quindi necessario ottimizzare la raccolta, la validazione e l'utilizzo delle informazioni per la PMS. Lo strumento preferenziale in tal senso potrà essere lo sviluppo del Registro Nazionale dei Farmaci Orfani (RNFO) per i FO disponibili nel SSN, istituito all'ISS (GU 23-25/11/2004).

Risultati attesi nel triennio

L'ottimizzazione e la validazione delle informazioni contenute nel Registro Nazionale Farmaci Orfani consentirà di mantenere un monitoraggio attivo sull'intera gestione dei pazienti affetti da malattie rare e in terapia con i farmaci orfani in esso compresi, costituendo una base di informazioni completa, affidabile e estesa sul territorio nazionale per definire appropriatezza d'uso, profilo di efficacia, sicurezza e tollerabilità.

Trasferibilità dei risultati

dati, raccolti secondo procedure armonizzate e validate sulla sicurezza ed efficacia dei farmaci orfani, potranno essere efficientemente analizzati in modo aggregato;

dati su prevalenza e incidenza delle malattie rare, trattate con i rispettivi farmaci orfani, in collegamento funzionale con la rete nazionale Malattie Rare.

flusso di dati continuo e fruibile da parte delle strutture del SSN.

Inoltre, sulla base delle informazioni ottenute sull'erogazione dei trattamenti, il Registro Nazionale Farmaci Orfani sarà fonte di informazioni sulle strutture specialistiche per ciascuna malattia rara, consentendone il coordinamento e l'uso efficiente delle risorse.

Ricerca di nuovi geni coinvolti nella deregolazione di vie di trasduzione del segnale nella patogenesi e progressione leucemica

La trasduzione del segnale ha un ruolo cruciale nel controllo del comportamento proliferativo, differenziativo e metabolico della cellula. Alterazioni di tale *network* di controllo contribuiscono in maniera sostanziale alla trasformazione neoplastica. I recenti progressi nella caratterizzazione degli eventi di deregolazione delle vie di trasduzione, come eventi molecolari causali nell'oncogenesi, hanno fornito nuovi strumenti per una corretta diagnosi e aperto nuove vie per un trattamento mirato delle neoplasie attraverso lo sviluppo di strategie terapeutiche specificamente dirette contro gli eventi molecolari responsabili.

Lo studio si propone la dissezione molecolare delle vie di trasduzione del segnale mediate dalle proteine RAS, PI3K e 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 sulla specifica via di trasduzione.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio porterà all'identificazione di nuovi meccanismi molecolari aventi un ruolo nella patogenesi e/o progressione leucemica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio potrebbero consentire, in linea di principio, l'individuazione di nuovi bersagli molecolari per terapie biologiche mirate. I risultati prodotti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Ruolo del Transforming Growth Factor beta1 (TGFB1) nella modulazione dei meccanismi patogenetici alla base delle endocrinopatie autoimmuni

L'insorgenza di endocrinopatie autoimmuni (diabete tipo1, tireopatie autoimmuni) è fortemente associata alla presenza di autoanticorpi organo-specifici anche se il loro ruolo nella patogenesi di tali patologie rimane ancora poco chiaro. Infatti, i veri mediatori del danno immunologico che si verifica a carico delle ghiandole endocrine coinvolte sono i meccanismi legati all'attività citotossica dei linfociti T autoreattivi e l'attivazione del complemento, cosicché gli autoanticorpi vengono generalmente considerati semplici marcatori della malattia. Per ciò che riguarda i possibili meccanismi alla base del controllo della risposta autoimmune, notevole interesse è rivolto all'azione immunomodulante del TGFBeta1 nel mantenimento dell'omeostasi immunologica e nella soppressione della risposta immune sia umorale che citotossica. Sono state riportate, infatti, ampie fluttuazioni dei livelli sierici di TGFBeta1 nelle fasi di remissione e di riacutizzazione di alcune patologie autoimmuni supportando l'ipotesi che l'azione di tale citochina possa rappresentare un efficace meccanismo endogeno anti-infiammatorio e immunosoppressivo. È stato proposto, inoltre, che almeno una parte del TGFBeta1 circolante possa essere veicolato dalle immunoglobuline sieriche e che tale legame possa restringere o dirigere l'azione della citochina a livello dei siti antigenici dove può svolgere un ruolo sulla omeostasi della risposta immune e nella soppressione delle risposte autoimmuni.

Risultati attesi nel triennio

I dati presenti in letteratura e i risultati di un nostro studio condotto su donne con una forma transitoria di tiroidite (tiroidite *post partum*), in cui abbiamo dimostrato che i livelli sierici della forma biologicamente attiva del TGFBeta1 aumentano durante la fase acuta della tiroidite parallelamente al titolo autoanticorpale e che entrambe i parametri (TGFB1 e autoAb) ritornano ai valori osservati durante la gravidanza man mano che le pazienti recuperano la condizione di eutiroidismo, ci hanno indotti ad ipotizzare che anche nell'uomo, così come dimostrato in diversi modelli sperimentali, gli autoAb possano partecipare ad un complesso e ad oggi ancora non chiarito meccanismo endogeno di protezione dall'aggressione citotossica dei linfociti T autoreattivi e che questa azione degli autoAb potrebbe essere mediata dalla loro stretta interazione con il TGFBeta1.

Per tale motivo ci proponiamo di:

Valutare il possibile ruolo del TGFB1 quale marcatore delle più rilevanti endocrinopatie autoimmuni, in particolare diabete tipo 1 e tiroidite, e di studiare le fluttuazioni sieriche della citochina durante il decorso clinico della malattia;

Studiare l'interazione tra autoanticorpi organo-specifici e TGFB1, quale possibile meccanismo di amplificazione delle proprietà immunosoppressive di tale citochina nelle risposte autoimmuni, e valutare la quota di TGFB1 eventualmente legata agli autoanticorpi.

Trasferibilità dei risultati

L'utilizzo del TGFBeta1 attivo quale marcatore di infiammazione offrirà la possibilità di individuare: 1) soggetti nelle fasi precoci della malattia con l'opportunità di effettuare un trattamento terapeutico precoce e 2) sottogruppi di pazienti con diverso decorso clinico, in particolare soggetti a maggior rischio di riacutizzazione o di remissione della malattia.

Inoltre, la dimostrazione della partecipazione degli autoanticorpi organo-specifici a meccanismi endogeni di protezione nella patogenesi delle endocrinopatie autoimmuni

consentirà di individuare nuove strategie terapeutiche per patologie ad elevato impatto socio-sanitario, quali diabete tipo1 e tireopatie su base autoimmune.

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 (DSBs). I DSBs costituiscono un evento cruciale nella morte neuronale associata a molte malattie neurodegenerative, tra le quali la malattia di Alzheimer (AD). Numerosi studi infatti 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 AD. Inoltre, colture neuronali ottenute da animali mutanti per la DNA-PK (quali i topi scid,) sono più sensibili alla morte neuronale indotta dal trattamento con beta-amiloide (A β) e glutammato.

Dati più recenti suggeriscono un ruolo alternativo della DNA-PK che vede tale chinasi coinvolta in processi di sopravvivenza cellulare mediati dall'attivazione di diversi *target* cruciali come IKK, NF- κ B e AKT. Alla luce di tali considerazioni, il nostro progetto di ricerca si propone di studiare il ruolo della DNA-PK nella degenerazione neuronale e nelle alterazioni della plasticità sinaptica, marcatori tipici di AD. A tal scopo verranno analizzati i *pathway* di sopravvivenza cellulare mediati dalla DNA-PK in cellule PC12 e in colture neuronali primarie di corteccia e ippocampo trattate con A β . Verranno inoltre effettuati esperimenti di elettrofisiologia per analizzare i fenomeni di plasticità neuronale, correlato elettrofisiologico dei processi di apprendimento e memoria, sia negli animali di controllo che negli animali mutanti per la DNA-PK.

Risultati attesi nel triennio

È stato ampiamente dimostrato che la beta-amiloide è in grado di indurre *stress* ossidativo attraverso la produzione di alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Alti livelli di ossidazione sono stati infatti riportati in cellule neuronali esposte a beta-amiloide non soltanto per i lipidi e le proteine ma anche per gli acidi nucleici. È quindi ragionevole ipotizzare una alterazione dell'espressione o della funzionalità della DNA-PK in cellule neuronali esposte a beta-amiloide, mediata dai ROS.

Nel presente progetto, verranno inoltre analizzati i meccanismi di sopravvivenza cellulare mediati dalla DNA-PK e identificato un suo eventuale ruolo diretto mediante utilizzo di specifici inibitori della sua attività chinastica. Si verificherà il ripristino dei livelli basali mediante incubazione con antiossidanti e/o mediante overespressione della DNA-PK ricombinante.

La plasticità neuronale verrà studiata in fettine di ippocampo di topi di controllo e di topi scid, applicando una stimolazione tetanica alle vie afferenti (collaterali di Schaffer) e analizzando il potenziamento a lungo termine (LTP).

Trasferibilità dei risultati

Il chiarimento delle caratteristiche molecolari che rendono i neuroni più suscettibili all'insulto nelle demenze di tipo Alzheimer, contribuirebbe allo sviluppo di strumenti di diagnosi precoce in tale malattia neurodegenerativa nonché allo sviluppo di nuovi *target* terapeutici.

Ruolo della timosina beta4 nel sistema nervoso centrale come agente protettivo e differenziativo

La timosina beta4 è un piccolo peptide di 43 amminoacidi ampiamente espresso, responsabile del sequestro cellulare dei monomeri di actina e quindi capace di influenzare i delicati equilibri di polimerizzazione della actina citoscheletrica. Benché, la timosina beta4 sia ampiamente espressa nel sistema nervoso centrale embrionale e adulto, la sua attività biologica in questo tessuto rimane a tutt'oggi inesplorata. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che, oltre agli effetti trofico/riparativi, la timosina beta4 potrebbe possedere una attività neuroprotettiva in particolari condizioni neuropatologiche. È infatti noto che, in seguito a ischemia focale, la timosina beta4 è sovraespressa nell'area cerebrale infartuata, suggerendo un possibile coinvolgimento della proteina nel recupero dei circuiti neuronali dopo danno ischemico. Se si considera che l'eccitotossicità è un fenomeno coinvolto nella patogenesi di molteplici malattie neurodegenerative, lo studio del potenziale neuroprotettivo della timosina beta4 potrebbe avere delle importanti applicazioni terapeutiche.

Il nostro laboratorio è interessato a chiarire il ruolo della timosina beta4 nel sistema nervoso centrale e in particolare come possibile fattore neuroprotettivo e differenziativo. A tale scopo ci focalizzeremo sul ruolo della timosina beta4: i) nella morte neuronale indotta da eccitotossicità; ii) nel differenziamento delle cellule staminali neurali.

Risultati attesi nel triennio

Uno degli aspetti di interesse del nostro laboratorio consiste nel verificare se la timosina beta4 possa rappresentare un fattore protettivo per i neuroni in coltura primaria in seguito a eccitotossicità da glutammato. L'azione protettiva sulle colture neuronali verrà testata sia mediante applicazione diretta nel terreno di coltura del peptide beta4 purificato, sia trasducendo le colture neuronali con lentivirus che permetteranno di overesprimere la timosina prima dei trattamenti di eccitotossicità. Un secondo aspetto di questo progetto, riguarda lo studio del ruolo della timosina beta4 nel promuovere il differenziamento di tipo neuronale. A tale scopo, cellule staminali neurali embrionali di topo e adulte di uomo verranno trasdotte con vettori lentivirali per indurre una sovraespressione della timosina beta4. Studi di immunofluorescenza utilizzando *marker* neuronali permetteranno di verificare gli effetti di tale sovraespressione sul differenziamento neuronale. Diversamente, l'utilizzo di vettori lentivirali che permettano di sovraesprimere l'antisense per la timosina beta4, verranno impiegati per analizzare come la mancata attività di questo peptide possa influenzare la sopravvivenza e la capacità differenziativa delle cellule staminali neurali. Considerando l'azione chiave svolta dalla timosina beta4 sul citoscheletro è possibile che alterazioni dei livelli cellulari di questo peptide possano interferire a diversi livelli sul differenziamento e sulla proliferazione delle cellule staminali.

Trasferibilità dei risultati

Qualora si dimostrasse un chiaro effetto della timosina beta4 nella modulazione dei fenomeni neurodegenerativi, tale informazione potrebbe costituire la base di partenza per lo sviluppo di strategie terapeutiche neuroprotettive. In aggiunta, un suo ruolo nel controllo del differenziamento e della proliferazione delle cellule staminali neurali, potrebbe aprire la porta a manipolazioni di queste cellule rendendole più resistenti e efficaci nel riparo di circuiti neuronali in seguito a danno.

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

Nonostante l'intensa attività di ricerca finalizzata a comprendere come HIV-1 riesce ad evadere e a sovvertire il sistema immunitario dell'ospite a suo vantaggio, i meccanismi

attraverso i quali l'infezione da HIV-1 conduce all'immunodeficienza non sono ancora del tutto compresi. Tuttavia, si ritiene che un ruolo importante sia svolto da fattori virali solubili, rilasciati in circolo o ai siti di replicazione, in grado di svolgere potenti effetti immunomodulatori su cellule non infettate produttivamente. Sulle base di queste considerazioni, il presente progetto di ricerca si propone di studiare l'effetto delle interazioni precoci di HIV-1 con cellule che presentano l'antigene (APC), quali i macrofagi e le cellule dendritiche (DC), allo scopo di identificarne le alterazioni funzionali rilevanti per la patogenesi della malattia da HIV-1. In particolare, saranno valutati gli effetti delle glicoproteina di superficie gp120, sia esposta alla superficie di virioni non infettivi che rilasciata in forma solubile. L'attività proposta si svilupperà su tre obiettivi principali:

Definizione degli effetti della gp120 da ceppi di HIV-1 a diverso tropismo sulle attività funzionali delle DC;

Caratterizzazione delle vie di traduzione del segnale attivate dalla gp120 in macrofagi e DC e loro ruolo nell'induzione di alterazioni funzionali;

Identificazione dei recettori che traducono i segnali indotti dalla gp120 in macrofagi e DCs.

Risultati attesi nel triennio

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 recettori di superficie presenti sulle APC coinvolti in questa attivazione, così come di associare l'attivazione di specifiche vie di traduzione del segnale con alcune delle alterazioni funzionali osservate in queste cellule. Il raggiungimento degli obiettivi proposti porterà ad un ampliamento delle conoscenze attuali sulla patogenesi dell'AIDS, a nuove interpretazioni di aspetti importanti dell'immunopatogenesi, e all'identificazione di nuovi 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 interventi terapeutici contro l'infezione di HIV-1.

Ruolo delle proteine del complesso associato alla distrofina nei meccanismi di *trafficking* e *signaling* intracellulari

Il complesso (DPC) di proteine associato alla distrofina, proteina la cui assenza causa la distrofia muscolare di Duchenne, costituisce una struttura funzionale altamente dinamica in grado di reclutare proteine coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale. Le distrobrevine costituiscono una famiglia di proteine omologhe alla distrofina che direttamente interagiscono con essa. Risultati recenti hanno dimostrato che la distrobrevina è in grado di interagire con diversi *partner* intracellulari e può essere considerata una proteina scaffold. In particolare nel nostro gruppo abbiamo dimostrato che può interagire con la catena pesante della chinesina neuronale e che lega la subunità regolatoria della proteina chinasi A. La distrobrevina è inoltre in grado di legare sia proteine postsinaptiche come la distrofina che presinaptiche come la disbindina, una proteina identificata recentemente e per la quale è stata dimostrata un'associazione con la suscettibilità alla schizofrenia. La disbindina è inoltre direttamente coinvolta in sindromi caratterizzate da un anomalo traffico vescicolare intracellulare quali la sindrome di Hermansky-Pudlak di tipo7 (HPS7). Ci si propone di valutare il ruolo della distrobrevina nei meccanismi di trasporto all'interno della cellula nervosa e come l'attivazione di meccanismi di signaling possa influenzare queste interazioni.

Risultati attesi nel triennio

Con questo progetto ci si propone di: 1. caratterizzare a livello molecolare le interazioni della distrobrevina con proteine postsinaptiche (distrofina) e presinaptiche (disbindina) nell'ipotesi di

un ruolo della distrobrevina nei meccanismi di *sorting* e *targeting* all'interno della cellula neuronale, e 2. valutare quali meccanismi di signaling possano modulare queste interazioni. Un coinvolgimento diretto della protein chinasi A si rivelerebbe particolarmente interessante alla luce di risultati recenti che indicano un ruolo del *signaling* mediato da cAMP in alcune patologie di tipo psichiatrico, inclusa la schizofrenia. L'approccio sperimentale prevede 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.

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.

Ruolo dello stress ossidativo nella modulazione dell'attività del K-Cl cotrasportatore (KCC2) in neuroni GABAergici: implicazioni nell'epilessia

L'azione del neurotrasmettitore inibitorio acido gamma-amminobutirrico (GABA) è dovuta essenzialmente all'attivazione dei recettori GABAA che permettono il flusso di ioni Cl⁻ attraverso la membrana postsinaptica. Nei neuroni maturi, l'attivazione dei recettori GABAA stimola l'influsso di Cl⁻ e l'iperpolarizzazione della membrana grazie al basso contenuto intracellulare di Cl⁻ mantenuto grazie all'azione del cotrasportatore del K-Cl specifico dei neuroni (KCC2), la cui espressione aumenta durante la prima settimana postnatale. Una modifica dell'attività di questo trasportatore si riflette in un'alterazione dei livelli intra e extracellulari di Cl⁻ e K⁺ con conseguenze sulla trasmissione sinaptica mediata dal GABA.

Ad oggi sono stati poco studiati i meccanismi che regolano l'attività del KCC2, ma numerosi lavori evidenziano che la sua attività è dipendente sia dalla fosforilazione in serina/treonina e/o in tirosina sia dallo stato *redox*. È stato dimostrato che l'inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2 si traduce in un'inibizione dell'attività del cotrasportatore, mentre l'inibizione dell'attività delle chinasi porterebbe ad una sua attivazione. Inoltre, in condizioni di *stress* ossidativo indotto da specie radicaliche o in particolari patologie il canale si attiva. Negli eritrociti, dove è espressa una isoforma del cotrasportatore neuronale (volume-sensitive KCC1), abbiamo dimostrato che l'attività del KCC1 è elevata in seguito a trattamento con agenti ossidanti quali il perossido di idrogeno, l'etilmaleimide o il perossinitrito (prodotto fisiologico della reazione tra radicale superossido e ossido nitrico). Inoltre, l'attività del cotrasportatore è sostanzialmente elevata negli eritrociti di topi *knockout* deficienti di due chinasi della famiglia di src (fgr e hck). Tutti questi studi suggeriscono che sia lo stato di fosforilazione sia lo stato *redox* giocano un ruolo importante nella regolazione dell'attività di questo cotrasportatore. Cambiamenti dell'espressione o dell'attività di KCC2 possono essere importanti in condizioni patologiche quali l'epilessia in cui è stata recentemente dimostrata una downregolazione di KCC2. Inoltre, sempre maggiori studi concordano nel considerare lo stress ossidativo importante nell'induzione e nella progressione dell'epilessia, e numerose evidenze dimostrano l'efficacia di una terapia antiossidante nella riduzione del danno in modelli animali di epilettogenesi.

Lo scopo del progetto è quello di studiare l'espressione e l'attività di KCC2 in seguito a un insulto ossidativo in cellule di ippocampo, nonché descrivere i meccanismi che intervengono nella regolazione l'attività del canale anche in modelli animali in cui epilessia è indotta farmacologicamente.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base delle nostre precedenti acquisizioni, il trattamento di cellule di ippocampo con agenti ossidanti, quali l'ossido nitrico (NO) o il perossinitrito, dovrebbe risultare in una modulazione dell'attività del KCC2. Tale modulazione potrebbe essere il risultato di un'azione diretta degli ossidanti sulla proteina, ma potrebbe anche derivare dalla modulazione dei segnali che regolano lo stato di fosforilazione del canale. Infatti, sia l'NO sia il perossinitrito stimolano i) la fosforilazione in tirosina attraverso l'attivazione delle chinasi della famiglia di src e l'inibizione delle fosfotirosina fosfatasi, ii) la fosforilazione in serina/treonina attraverso l'inibizione della fosfatasi PP1 che a sua volta, insieme a PP2, influenza lo stato di fosforilazione del KCC2. Un'altra via di regolazione che verrà valutata prevede l'attivazione da parte degli ossidanti della tirosina chinasi TrkB (recettore del BDNF) in assenza del ligando che attraverso il *pathway* Shc e PLCg potrebbe indurre una downregolazione di KCC2. Inoltre, il progetto prevede anche lo studio dei meccanismi che regolano KCC2 in modelli animali di epilessia, ossia in condizioni in cui vi sia uno *stress* ossidativo endogeno e in cui sia stata descritta una compromissione nel mantenimento dei bassi livelli di Cl⁻ intracellulare necessari per l'iperpolarizzazione inibitoria postsinaptica della trasmissione GABAergica.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio permetterà di capire meglio quale sia il ruolo dello stress ossidativo nelle patologie in cui l'eziologia può essere ricondotta ad una compromissione della trasmissione GABAergica. In particolare, si vuole approfondire e studiare le vie che regolano l'espressione e l'attività del cotrasportatore K-Cl in quanto *partner* fondamentale del neurotrasmettitore inibitorio GABA. Qualora lo studio evidenziasse una correlazione tra *stress* ossidativo e alterazione del KCC2 sia a livello di espressione che di attività in condizioni patologiche, quali l'epilessia, questo potrà servire per individuare terapie che prevedano l'uso di antiossidanti come coadiuvanti nel trattamento di questa patologia cronica con ripercussioni nel miglioramento della qualità della vita.

Ruolo funzionale e coinvolgimento in patologie neurodegenerative del complesso di proteine-associate alla distrofina

L'obiettivo principale della ricerca è contribuire a definire le interazioni intramolecolari e il ruolo dei complessi multiproteici di proteine associate alla distrofina (DPC) in cellule del sistema nervoso e negli eventi cellulari attivati in processi neurodegenerativi e da alterazioni dell'adesione cellula-matrice extracellulare. Il DPC è presente in diversi sottotipi neuronali e in cellule gliali fornendo un legame strutturale e funzionale tra componenti extracellulari e citoscheletro cellulare. La presenza del DPC alle sinapsi di neuroni in aree cerebrali coinvolte nei processi verbali e nelle funzioni cognitive, di memoria e movimento e in astrociti a contatto con la lamina basale e con i vasi alla barriera emato-encefalica suggerisce che questi complessi partecipino all'organizzazione di contatti intercellulari altamente specializzati. Evidenze sperimentali indicano che proteine del DPC sono coinvolte in alcune malattie genetiche rare (Walker-Warburg-Syndrome WWS; *muscle-eye-brain disease*, alcune forme di distrofie muscolari congenite e lissoencefalopatie) associate ad alterazione della migrazione neuronale e con difetti oculari e della retina. Studi recenti, inclusi quelli del nostro gruppo, hanno dimostrato che alcuni componenti del DPC potrebbero essere coinvolti nel trasporto intracellulare, nell'organizzazione e stabilizzazione di proteine di membrana (come recettori, canali ionici e trasportatori) e di proteine regolatorie coinvolte nella trasmissione di segnali intracellulari. La comprensione del ruolo fisiopatologico del DPC nel sistema nervoso permetterà l'identificazione di nuovi bersagli molecolari coinvolti negli eventi cellulari attivati in neuroni e in astrociti in seguito a danno neuronale e alterazione nell'adesione alla matrice extracellulare.

Risultati attesi nel triennio

i) migliore comprensione dell'organizzazione molecolare del complesso multiproteico di proteine associate alla distrofina negli astrociti a livello della barriera emato-encefalica e nei neuroni al livello sinaptico; ii) caratterizzazione *in vitro* e *in vivo* delle interazioni tra distrobrevina e le proteine che con essa interagiscono iii) identificazione dei fattori che possono regolare la formazione e la stabilità del legame tra regioni specifiche di componenti del DPC; iv) comprensione delle alterazioni dei componenti del DPC in modelli di neuropatologia

Trasferibilità dei risultati

Questo studio e l'impegno focalizzato a chiarire il ruolo fisiopatologico del complesso di proteine associate alla distrofina potrà portare all'identificazione di nuovi bersagli molecolari quali potenziali siti per strategie neuroprotettive e fornire indicazioni utili per nuove strategie terapeutiche. I risultati ottenuti saranno inviati per la pubblicazione a riviste scientifiche internazionali.

Ruolo oncogenico di PTPN11 nelle leucemie in età pediatrica

Le leucemie costituiscono il gruppo di tumori pediatrici più frequenti, rappresentando oltre un terzo di tutte le neoplasie che insorgono nei bambini e costituendo la prima causa di morte in età pediatrica nei paesi occidentali.

Il gene PTPN11 codifica per SHP-2, una proteina citoplasmatica con attività tirosin-fosfatase che interviene nella trasduzione del segnale promosso da numerosi fattori di crescita e citochine. SHP-2 è necessaria durante lo sviluppo embrionale e mutazioni che promuovono un guadagno di funzione della proteina costituiscono la principale causa molecolare della sindrome di Noonan. Più recentemente, una nuova classe di mutazioni attivanti di PTPN11 è stata identificata in diverse forme leucemiche in età pediatrica.

Il progetto ha come obiettivo lo studio della rilevanza clinica delle mutazioni di PTPN11 nelle leucemie in età pediatrica e la comprensione del ruolo oncogenico di tali mutazioni. Lo studio utilizzerà biobanche già disponibili presso centri di riferimento nazionali e internazionali e sarà anche esteso a tumori solidi infantili per i quali è noto il coinvolgimento della via del segnale mediata dalle proteine RAS. Gli studi funzionali saranno mirati alla verifica dell'ipotesi che la ridotta stabilità della conformazione cataliticamente inattiva di SHP-2 favorisca una sua interazione più prolungata con i *partner* di trasduzione del segnale. Sarà inoltre analizzato l'effetto delle mutazioni nelle vie di trasduzione del segnale implicate nella patogenesi leucemica.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio consentirà di delineare la rilevanza biologica e clinica delle mutazioni del gene PTPN11 nelle leucemie e in altre forme tumorali dell'età pediatrica, e alla comprensione del loro significato funzionale.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio fornirà una valutazione del ruolo di PTPN11 nella tumorigenesi e nella progressione tumorale e conseguentemente permetterà di valutare l'importanza di SHP-2 come nuovo possibile bersaglio molecolare per la terapia delle leucemie e dei tumori solidi. I risultati prodotti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Segnali RM e profili metabolici di tumori umani: identificazione di marcatori di progressione e di nuovi bersagli terapeutici

La recente scoperta mediante risonanza magnetica (RM) di anomalie nel metabolismo della fosfatidilcolina (PC) in tumori umani, collegate ad attivazioni gene-mediate dei *pathway* di

trasduzione del segnale recettoriale e del sistema MEK/MAPK, consente di identificare nuovi indicatori di progressione tumorale e progettare nuove strategie terapeutiche mirate. Inoltre, segnali RM di lipidi neutri mobili (ML) rappresentano indicatori non-invasivi di alterazioni nel metabolismo di acidi grassi e nella bioenergetica della cellula neoplastica. Mediante uso integrato di RM, microscopia confocale laser e analisi cellulari e molecolari, il Progetto, condotto presso il Reparto ICM, si propone di valutare il significato di alterazioni nel ciclo della PC e nel *turnover* di lipidi neutri e dei corrispondenti segnali RM, come indicatori di diagnosi e risposta a terapie basate su *knockout* di vie metaboliche attivate in tumori umani altamente invasivi, quali il carcinoma ovarico (k-OV), carcinoma mammario (k-Br) esprimente Her2/neu e carcinoma del colon (k-Co). Il programma comprende cinque linee di ricerca tra loro integrate: 1) Alterazioni del ciclo della PC come bersagli multipli di nuove terapie nel k-OV e k-Co; 2) Ruolo della fosfolipasi C PC-specifica nella progressione del k-Br; 3) Profili metabolici *in vivo* ed *ex vivo* nel k-Br; 4) Trial multicentrico su diagnosi precoce del k-Br in soggetti a rischio genetico; 5) Metabolismo lipidico e attività mitocondriale in cellule leucemiche.

Risultati attesi nel triennio

1) Caratterizzare le attività di enzimi della PC in cellule di carcinoma k-OV e k-Co, in relazione alla progressione tumorale; valutare gli effetti del silenziamento (si-RNA) e *down-regolazione* di questi enzimi come target multipli di terapie anti-metaboliche in cellule di k-OV umano e in modelli di k-OV in topi SCID o nudi; 2) Caratterizzare espressione e attività della fosfolipasi C PC-specifica in cellule k-Br, in relazione a espressione/attivazione di EGFR e ErbB2; 3) Analisi comparativa di profili metabolici in spettri RM di k-Br *in vivo* e analisi RM *ex vivo* su prelievi biotipici, al fine di correlare i segnali di derivati della PC con *grading* di malignità e stato linfonodale determinati su base istopatologica; 4) Valutare il ruolo dell'*imaging* RM a contrasto dinamico (CE-MRI) nella diagnosi precoce di k-Br in soggetti portatori di mutazioni deleterie BRCA1 o BRCA2 o appartenenti a famiglie ad alta incidenza di k-Br e/o k-OV; 5) Valutare il significato di segnali ML come indicatori di funzionalità mitocondriale e stato bioenergetico in cellule leucemiche, in relazione a proliferazione cellulare e apoptosi.

Gruppo IMC (F Podo, C Ramoni, E Iorio, G Carpinelli, R Canese, M Di Vito, F Spadaro, S Cecchetti, L Lugini, M Giannini, A Ricci) in coll. con Reparto di Immunoterapia (ISS); Ist. Nazionale Tumori (MI); Ist. Tumori Regina Elena (RM); Policlinico San Donato (MI); Trial multicentrico italiano ISS MRI/BRCA (HiBCRIT); Univ. La Sapienza (RM); Univ. L'Aquila.

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione degli obiettivi di questo Progetto di ricerca a carattere traslazionale può avere rilevanti ricadute nella diagnostica radiologica e nell'oncologia clinica, in relazione a i) individuazione di nuovi indicatori di progressione tumorale in carcinomi epiteliali *in vivo*, rivelabili mediante esami RM su paziente; ii) integrazione di esami RM *in vivo* con analisi *ex vivo* su biopsie di k-Br, al fine di ottimizzare le strategie di intervento e cura; iii) Realizzazione di un *network* e proposta di un piano nazionale di sorveglianza per soggetti ad alto rischio genetico di k-Br; iv) Proposta e validazione su modelli preclinici di nuove terapie mirate contro enzimi attivati in cellule tumorali di origine epiteliale ad alto grado di invasività; v) Preparazione delle basi conoscitive per l'ulteriore sviluppo di metodi di *imaging* non invasivo basati sulle alterazioni del metabolismo della colina (RM, PET) per la diagnostica e il monitoraggio *in vivo* di nuovi *endpoint* farmacologici.

Sindrome plurimetabolica e rimodellamento della massa adiposa: ruolo dell'iperglicemia e dell'insulino-resistenza

La sindrome metabolica è una condizione clinica in cui sono spesso associati diabete tipo 2 e obesità di vario grado, facendo ipotizzare l'azione di meccanismi patogenetici comuni. L'eccessivo accumulo di adipe deriva da un alterato rimodellamento tissutale, che coinvolge essenzialmente il comparto cellulare, costituito dagli adipociti maturi e dai preadipociti. Le alterazioni metaboliche indotte dal diabete potrebbero regolare il grado di adiposità attraverso gli stessi meccanismi operanti nell'alterato rimodellamento vascolare. Studi recenti hanno a loro volta dimostrato che il tessuto adiposo potrebbe essere sede di produzione di citochine infiammatorie che hanno un ruolo nella patogenesi del danno vascolare aterosclerotico. Si innescherebbe così un circolo vizioso di potenziamento reciproco dei fattori metabolici sulle lesioni vascolari.

Nostri studi attualmente in corso su un modello cellulare hanno già dato risultati preliminari che avvalorano il ruolo dell'iperglicemia e dell'iperinsulinemia in questi meccanismi, facendo supporre un possibile effetto sinergico di due patologie così strettamente interrelate. I progetti futuri mirano ad approfondire il ruolo delle alterazioni metaboliche correlate al diabete tipo 2 nel determinismo della massa grassa e del danno vascolare, attraverso modelli cellulari e animali che mimino le condizioni di iperglicemia e iperinsulinemia in cui verranno valutati parametri pro-infiammatori e del rimodellamento tissutale.

Risultati attesi nel triennio

I risultati di questa linea di ricerca potrebbero: 1) contribuire alla comprensione dei meccanismi che sono alla base della vasculopatia aterosclerotica in corso di sindrome metabolica e del ruolo dell'eccesso di glucosio e dell'obesità in tali eventi; 2) indicare potenziali interventi basati sull'interferenza di queste vie metaboliche

Trasferibilità dei risultati

La comprensione dei meccanismi patogenetici operanti nell'instaurarsi delle complicanze vascolari in corso di sindrome metabolica potrebbe consentire di individuare nuove strategie di intervento sia in prevenzione che nel trattamento di complicanze invalidanti per il paziente. È importante ricordare che la patologia vascolare rappresenta una delle principali cause di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati e che la cosiddetta "diabesità" è ormai considerata un'emergenza, dal punto di vista epidemiologico, a livello mondiale, costituendo, inoltre, un notevole onere per il sistema socio-sanitario

Studio comparativo dell'effetto adiuvante di IFN di tipo I nella preparazione di vaccini antivirali

Lo sforzo di ridurre gli effetti collaterali durante la pratica vaccinale richiede la preparazione di vaccini sempre più purificati ma determina una conseguente riduzione del loro potere immunogenico. L'identificazione di un adiuvante naturale in grado di promuovere una risposta immunitaria selettiva e efficace contro agenti infettivi costituisce un obiettivo di primaria importanza nella ricerca immunologica e nella pratica clinica. Studi recenti in modelli murini hanno dimostrato che l'interferon alfa/beta (IFN I) endogeno è necessario per l'induzione di una risposta immunitaria del tipo Th1 da parte degli adiuvanti vaccinali più comunemente usati. L'IFN I stesso, somministrato insieme ad un vaccino influenzale purificato, ha mostrato di avere un effetto adiuvante estremamente potente nel topo e di indurre una risposta protettiva contro l'infezione virale in tempi molto più rapidi rispetto al vaccino da solo (Proietti E, et al. *Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model*. J Immunol. 2002. 169:375-83). L'IFN I, studiato da tempo per i suoi effetti antivirali e antitumorali, è stata la prima citochina ad essere messa in commercio e i suoi effetti e la sua

tossicità sull'uomo sono ampiamente conosciuti. L'uso di questa citochina in associazione con il vaccino influenzale rappresenta uno strumento di grande interesse per una rapida azione preventiva in caso di nuove manifestazioni pandemiche, la sua associazione al vaccino contro l'epatite B potrebbe ridurre il numero di somministrazioni e permettere di raggiungere rapidamente livelli di protezione nei soggetti *low responders*.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto di ricerca si pone la finalità di approfondire alcuni aspetti relativi ai meccanismi della attività regolatrice dell'IFN I sulla risposta immunitaria umorale e cellulare ad alcuni vaccini virali e sarà articolato negli obiettivi sotto indicati:

Analisi comparativa delle diverse modalità di somministrazione (i.m, i.n., orale, i.p. etc.) di IFN di tipo I sulla sua capacità adiuvante in un modello di vaccinazione antinfluenzale. Lo studio comparativo di diverse modalità di somministrazione dell'IFN I rispetto al vaccino potrà fornire indicazioni sui meccanismi della risposta immunitaria responsabili dell'effetto adiuvante e suggerire nuove modalità applicative dell'uso dell'IFN I come adiuvante.

Studio dell'effetto adiuvante di IFN I in una popolazione di animali invecchiati. La risposta vaccinale in soggetti vecchi rappresenta un capitolo di notevole interesse in ambito immunologico, soprattutto per i suoi aspetti applicativi in una popolazione che rappresenta uno dei bersagli principali della vaccinazione influenzale.

Studio delle popolazioni cellulari coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria antigene specifica durante vaccinazione antinfluenzale e contemporanea somministrazione di IFN I. Questo studio si avvale della disponibilità di topi transgenici (C57 22.99), costruiti nel laboratorio del prof. M. Tovey (Villejuif, Francia), nei quali il gene della *green fluorescence protein* (GFP) è stato posto sotto il controllo di un promotore di un gene attivato da IFN I (IAG). Saranno anche utilizzati topi KO per il recettore dell'IL-15 per valutare l'importanza di questa citochina nella catena di eventi indotti da IFN I rispetto agli altri adiuvanti di riferimento.

Uso del modello di vaccinazione antinfluenzale per la valutazione dell'effetto adiuvante di diversi composti. Il modello di vaccinazione influenzale nel topo si presta in modo ottimale per effettuare una analisi comparativa della potenza e della qualità (prevalenza di risposta Th1 o Th2) dell'effetto adiuvante di diversi composti di recente interesse come: IFN, CpG, MF59, tossine batteriche modificate, e di adiuvanti classici.

Trasferibilità dei risultati

Il modello di infezione influenzale nel topo costituisce uno strumento completo per la valutazione dell'efficacia degli adiuvanti immunologici. Esso, infatti, consente sia di misurare l'intensità della risposta immunitaria al vaccino, sia di valutare l'effetto protettivo della vaccinazione rispetto ad un successivo challenge con dosi letali o subletali di virus. Questo modello, pertanto, si presta allo studio comparativo di diversi adiuvanti per vaccini utilizzabili per diverse vie (i.m., s.c., intra naso ecc.).

La dimostrazione dell'attività aiuvante di interferon di tipo I apre nuove prospettive alla formulazione di vaccini. Basata sull'attività stimolatoria e differenziativa delle cellule dendritiche al momento dell'avvio della risposta immunitaria, l'attività adiuvante di interferon di tipo I si ottiene con la semplice somministrazione della citochina in concomitanza con quella del vaccino. Per questo non è necessario mescolare i due composti superando, così, i problemi complessi della formulazione vaccinale.

Studio degli effetti sulla funzione tiroidea dell'esposizione professionale a pesticidi organofosforici

Sempre maggiori evidenze sperimentali suggeriscono come alcune sostanze utilizzate in agricoltura, quali fungicidi, erbicidi o biocidi, siano in grado di interferire con la funzione

endocrina. La tiroide rappresenta uno dei principali bersagli di alcuni di questi Interferenti Endocrini. In particolare, vi è un crescente interesse nei confronti degli effetti tireostatici di insetticidi ampiamente utilizzati in campo agricolo e nelle disinfestazioni, quali gli organofosforici. Tra questi il più usato è il *Clorpirifos* (CPF), un potente inibitore dell'acetilcolinesterasi per il quale, recentemente e sulla base di studi condotti su modelli sperimentali, è stata ipotizzata anche una azione tireostatica.

Data la necessità di stabilire gli effetti sulla salute umana derivante dall'esposizione a tali sostanze, è stato attivato uno studio che si propone di valutare il possibile rapporto di causa-effetto tra esposizione a pesticidi organofosforici, in combinazione con altri pesticidi ad azione tireostatica e/o alla carenza iodica ambientale, e alto rischio di patologie tiroidee segnalato nella popolazione rurale del Comune di Maddaloni dai medici di medicina generale operanti sul territorio della provincia di Caserta.

Risultati attesi nel triennio

Nell'area geografica del Comune di Maddaloni è presente un'importante attività agricola che riveste un ruolo rilevante nell'economia, ma anche nelle abitudini alimentari e, in generale, nella cultura dei residenti in quest'area. Si tratta di una attività di tipo ortofrutticolo e tabacchicoltura, in cui l'uso di pesticidi è ampiamente diffuso. I soggetti maggiormente esposti a tali sostanze sono sicuramente gli agricoltori, sia direttamente per motivi professionali che attraverso la catena alimentare. Un'esposizione alimentare a pesticidi è comunque ipotizzabile anche per i soggetti non professionalmente esposti residenti sia nelle aree rurali che urbane dell'area geografica sopra indicata. Per tale motivo lo studio si propone di: 1) stimare il rischio di patologia tiroidea nella popolazione rurale e urbana dell'intero Comune grazie alla collaborazione dei medici di medicina generale che operano sul territorio i quali metteranno a disposizione il loro database relativo a circa 10000 assistiti; 2) stabilire il ruolo dell'esposizione a pesticidi (organofosforici/EBDC) e della carenza iodica ambientale nell'insorgenza di patologie tiroidee attraverso la valutazione di marcatori di esposizione e di marcatori di effetto.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio contribuiranno ad aumentare la base conoscitiva necessaria a stabilire il ruolo delle esposizioni a pesticidi nell'insorgenza delle malattie della tiroide e ad individuare eventuali segmenti di popolazione a maggior rischio di tali effetti. 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 per le patologie tiroidee strettamente legati al territorio.

Studio dei fattori responsabili dell'alterata omeostasi T cellulare nelle patologie immunomediate e loro modulazione

L'omeostasi linfocitaria è regolata non soltanto dalla proliferazione e differenziazione cellulare ma anche dalla morte cellulare programmata (apoptosi). Un aumento dell'apoptosi, secondario a una persistente attivazione del sistema immune, può condurre a linfopenia ed esaurimento della funzione timica. Al fine di mantenere un numero "normale" di cellule T, i linfociti T vergini proliferano intensamente in periferia con restrizione della diversità del repertorio BV del recettore per l'antigene della cellula T (TCRBV). Ne consegue un difetto della sorveglianza immunitaria e quindi una maggiore frequenza di infezioni ricorrenti, malattie autoimmuni e, nei casi più gravi, di tumori. Di contro una riduzione dell'apoptosi può condurre alla comparsa di malattie autoimmuni, disordini immunitari su base genetica o infettiva caratterizzati da un'aumentata e cronica linfoproliferazione. I principali obiettivi del progetto sono: i) valutazione dei meccanismi patogenetici coinvolti nella disregolazione dell'omeostasi T cellulare con particolare riferimento alla cascata apoptotica mediata da CD95/Fas e al ruolo dei

mitocondri; ii) studio *in vitro* di agenti capaci di modulare l'apoptosi linfocitaria. Le patologie oggetto di studio comprenderanno tra le Immunodeficienze primitive la Immunodeficienza Comune Variabile (ICV) e tra le malattie autoimmuni alcune classificate come rare, quali la sindrome di Evans, e altre di maggiore prevalenza nella popolazione quali la sclerodermia.

Risultati attesi nel triennio

i) Individuazione nelle patologie oggetto di studio dei principali fattori responsabili della alterata omeostasi T cellulare; ii) individuazione e valutazione di bioindicatori di malattia utilizzabili sia a fini diagnostici che prognostici; iii) individuazione e valutazione *in vitro* di molecole capaci di modulare l'apoptosi linfocitaria.

Trasferibilità dei risultati

L'insieme dei risultati ottenuti dovrebbe portare a una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie oggetto di studio e allo sviluppo di nuovi protocolli diagnostici. Inoltre l'individuazione di sostanze capaci *in vitro* e *in vivo* di ristabilire una corretta omeostasi linfocitaria potrebbe contribuire allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Studio dei meccanismi del sinergismo tra chemio e immunoterapia nel trattamento dei tumori

Il miglioramento delle tecnologie necessarie per promuovere l'attivazione e l'espansione di cloni linfocitari verso antigeni tumorali e il progresso delle conoscenze dei meccanismi regolatori della risposta immunitaria costituiscono un valido rationale per riesaminare il trasferimento di linfociti (trasferimento adottivo), sostenuto dal trattamento con citochine o associato a chemioterapia, come strategia terapeutica per la cura dei tumori. Infatti, la maggior parte degli studi di immunoterapia dei tumori mostra un soddisfacente raggiungimento della soglia di attivazione di una risposta immunitaria specifica che, però, non correla o correla poco con un'adeguata efficacia terapeutica. La manipolazione dei meccanismi di regolazione dei circuiti immunosoppressori *in vivo*, mediante uso di citochine o farmaci chemioterapeutici costituisce, pertanto, uno strumento di ulteriore potenziamento della risposta immunitaria antitumorale capace di rendere efficace una immunoterapia attiva. Inoltre, la validità, tuttora indiscussa, dei trattamenti radio o chemioterapici come prima linea di intervento contro i tumori, impone, nella maggior parte dei casi, la necessità di conoscere le modalità di interazione tra questi trattamenti e l'immunoterapia.

Ricerche svolte sull'associazione di citochine e chemioterapici e sulla combinazione di chemioterapici e immunoterapia adottiva in diversi modelli sperimentali di tumore, costituiscono un consistente patrimonio dell'Istituto Superiore di Sanità per promuovere studi di approfondimento dei meccanismi coinvolti nel potenziamento della risposta immune antitumorale finalizzati al disegno di protocolli terapeutici di chemio-immunoterapia in pazienti oncologici

Risultati attesi nel triennio

Il successo di una immunoterapia adottiva specifica contro il tumore dipende essenzialmente da tre fattori: i) la presenza di una consistente popolazione di linfociti T specifici per antigeni tumorali; ii) lo "spazio" per cui queste popolazioni linfocitarie tumore specifiche possano proliferare a sufficienza, trascinate dai meccanismi che controllano l'omeostasi linfocitaria; iii) i fattori di crescita (citochine, growth factors ecc.) necessari all'espansione dei linfociti tumore-specifici e alla loro attivazione. Il programma prevede l'identificazione di tutti questi elementi mediante:

Studi in modelli animali

Valutazione delle interazioni del trattamento con chemioterapici modello (ciclofosfamide e suoi analoghi) con strategie di immunizzazione antitumorale di vario tipo (valutazione sull'efficacia e sui correlati della risposta immunitaria antitumorale).

Identificazione delle popolazioni linfocitarie responsabili del trasferimento adottivo dell'immunità antitumorale, con particolare riguardo ai *subset* di linfociti T CD4 (CD4+CD25- e CD4+CD25+).

Studio comparativo di diversi farmaci antineoplastici in associazione con immunoterapia adottiva in termini di efficacia, valutazione della modulazione dell'espressione di geni di citochine e fattori di crescita (e dei loro prodotti), coinvolti nella regolazione delle attività del sistema immunitario e della omeostasi del sistema emopoietico.

Studi preliminari nell'uomo

Studi clinici pilota (fase I/II) di immunizzazione con vaccini peptidici in associazione a Dacarbazina in pazienti con melanoma per valutare la risposta tumore-specifica, valutare la modulazione dell'espressione di geni di citochine e fattori di crescita (e dei loro prodotti), studiare la frequenza delle popolazioni linfocitarie T CD4 (CD4+CD25- e CD4+CD25+).

Studi clinici pilota (fase I/II) in pazienti con melanoma, sottoposti a immunizzazione attiva contro il tumore, di reinfusione dei linfociti immuni dopo trattamento con ciclofosfamide.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di strategie di potenziamento della risposta a vaccini antitumorali in associazione a trattamento con chemioterapici fornirà nuovi strumenti di intervento terapeutico da usare in aggiunta a quelli esistenti soprattutto in quelle fasi della malattia neoplastica in cui non è consigliato alcun altro tipo di intervento come l'intervallo libero da malattia successivo ad intervento chirurgico. La definizione delle caratteristiche essenziali perché un chemioterapico possa funzionare come potenziatore della risposta immune in associazione a vaccinazione o a immunoterapia adottiva porterà a rivisitare l'uso di molti chemioterapici e a stabilire una loro nuova strategia di impiego nella malattia neoplastica. La combinazione di chemioterapia con la vaccinazione antitumorale permetterà di riconsiderare quei vaccini che altrimenti determinano risposte insufficienti per una attività terapeutica e rischiano di essere scartati per una loro applicazione clinica.

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

Studi sperimentali, clinici e epidemiologici documentano il ruolo danno ossidativo nei fenomeni degenerativi che caratterizzano di molte patologie neurodegenerative ad alto impatto sulla sanità pubblica, quali la malattia di Alzheimer (MA) e la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Studi epidemiologici hanno evidenziato che soggetti trattati con farmaci antinfiammatori per lunghi periodi risultano apparentemente protetti dalle malattie dell'invecchiamento quali la MA. Studi genetici di popolazione hanno permesso di identificare alcuni polimorfismi associati a una maggiore o minore suscettibilità alla MA (ad esempio il genotipo ApoE e4) o il polimorfismo al codone 129 del gene che codifica per la proteina prionica PrPc. È stata avanzata l'ipotesi che una maggiore o minore capacità di controllare la risposta infiammatoria e immunitaria indotte dai vari eventi patogeni nel corso della vita, possa contribuire alla elevata variabilità individuale nella suscettibilità o resistenza all'insorgenza di patologie degenerative.

Al fine di verificare questa ipotesi infiammatoria ci proponiamo di identificare in liquidi biologici quali plasma e *liquor*, dei parametri biochimici che consentano di ottenere una stima globale della capacità dell'organismo di "resistere" a un insulto di tipo ossidativo e di correlarli a indici infiammatori e al decorso della patologia.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto, iniziato nel 2004 con durata triennale, è articolato su due studi clinici:

1) uno studio clinico sezionale, in cui verrà misurato la capacità anti-ossidante (AOC) presente nel *liquor* e plasma di pazienti affetti da malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ, in collaborazione con Dr. Pocchiari, ISS);

2) uno studio clinico longitudinale, in cui gli stessi parametri saranno misurati in campioni di plasma ottenuti da soggetti arruolati in uno studio osservazionale (in collaborazione con l'università di Oxford, UK) in cui i soggetti arruolati si sottopongono a un prelievo annuale di sangue e *liquor*, contestualmente ad un esame neurologico. Da questo gruppo di soggetti verranno selezionati almeno 20 soggetti che non hanno sviluppato *deficit* cognitivi nell'arco di almeno 5 anni di osservazione e un uguale numero di individui che hanno sviluppato MA (diagnosi confermata anche da esame istopatologico).

In questi studi intendiamo valutare se la capacità di difesa dall'insulto ossidativo e il quadro infiammatorio sono alterati nei pazienti affetti da MA e MCJ, se tali alterazioni sono predittive del decorso della malattia.

Trasferibilità dei risultati

Utilizzo della misurazione della capacità antiossidante plasmatica nella definizione della una integrazione della terapia farmacologica con antiossidanti e nella valutazione della sua efficacia.

Presentazione alla comunità scientifica dei risultati raggiunti attraverso la pubblicazione su riviste scientifiche internazionali e/o comunicazioni a convegni nazionali e internazionali

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

Studi di *linkage* condotti sul genoma hanno rivelato l'esistenza di numerosi *loci* coinvolti nell'Alzheimer (AD); tuttavia, gli studi di associazione finora condotti, non sono sufficienti a spiegare l'ampia variabilità dei fenotipi osservati. Infatti, sia studi teorici che studi condotti su grandi *pedegree* familiari affetti dalla forma autosomica dominante dell'AD hanno rilevato che esisterebbero alcune forme alleliche, non ancora identificate, responsabili della malattia. Recentemente sono stati individuati alcuni geni funzionali potenziali candidati per l'AD, raggruppati in famiglie di omologia, i cui prodotti si legano al dominio citoplasmatico del precursore dell'amiloide, mediante interazione diretta con un motivo di legame alle fosfotirosine. La famiglia A comprende, tra le altre, la proteina APBA1 localizzata sul cromosoma 9. La famiglia B, comprende la proteina Fe65 sul cromosoma 11 (APBB1) che si lega specificatamente al dominio carbossiterminale dell'APP. E infine, una proteina non omologa alle precedenti, che interagisce anch'essa con il dominio citoplasmatico dell'APP e che cosegrega con la frazione cellulare associata alla membrana. Il suo gene, l'APPBP2 (Amyloid Beta A4 Precursor Protein-Binding Protein 2) è localizzato sul cromosoma 17. Il significato fisiologico del legame tra queste proteine e il precursore dell'amiloide sembrerebbe stabilizzare l'APP, forse inibendo così la produzione del peptide A-beta che si deposita nel cervello dei malati Alzheimer.

Risultati attesi nel triennio

L'identificazione del ruolo svolto da questi geni potrebbe aprire un promettente campo di ricerca. Infatti, alcuni di essi potrebbero rappresentare nuovi geni di suscettibilità le cui forme alleliche, per domini funzionali specifici, potrebbero modificare l'età di esordio e/o la durata della malattia e/o la sintomatologia clinica. Alternativamente le loro mutazioni potrebbero essere causali per alcune forme di AD ereditario i cui geni non sono stati ancora identificati. Attualmente è in corso l'analisi genetica dei possibili fattori di suscettibilità alla malattia nei geni menzionati, geni che si legano al dominio citoplasmatico del precursore dell'amiloide. In

particolare, lo screening finora effettuato sul gene dell'APBA1 ha rilevato la presenza di una variante genica riscontrata su due dei cinquanta pazienti analizzati, affetti da AD, ma non osservata in una popolazione di controllo comparabile per sesso e età. Mentre, l'analisi condotta sul gene APBB1 ha condotto all'individuazione di una variante genica presente sia in forma eterozigote che omozigote e della quale si sta valutando la frequenza allelica, nella popolazione finora esaminata.

Trasferibilità dei risultati

I risultati che ci proponiamo di ottenere con questo studio, potrebbero contribuire allo sviluppo di metodiche diagnostiche per consentire, mediante lo studio del profilo genetico, una precoce individuazione di eventuali soggetti a rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer. La disponibilità di nuovi parametri genetici per l'inquadramento dei pazienti affetti fornirà al clinico la possibilità di diagnosticare precocemente la patologia e la possibilità di un tempestivo intervento farmacologico.

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

Molte malattie neurodegenerative sono caratterizzate dall'alterazione di una proteina cellulare che assume una conformazione patologica e forma fibrille amiloidee. Le fibrille sono considerate il fattore di innesco dei meccanismi di neurodegenerazione e anche marker diagnostici specifici. L'obiettivo è la ricerca di tecniche di diagnosi precoce (tra le altre amplificazione del segnale tramite porfirine) mediante lo studio dei meccanismi patogenetici.

Il meccanismo di produzione dell'amiloide è specifico per le diverse patologie, ma gli eventi patogenetici hanno diversi punti di somiglianza. 1) Studi sperimentali documentano la presenza di attivazione microgliale e di risposta infiammatoria atipica nei fenomeni degenerativi di alcune neuropatologie, quali la malattia di Alzheimer (AD) e la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD). 2) Le fibrille amiloidee non hanno soltanto un ruolo indiretto sulla neurodegenerazione, ma sembrano anche in grado di agire direttamente sulla vitalità cellulare. 3) Topi transgenici che overesprimono la PrP cellulare hanno tempi di incubazione ridotti. La coinfezione Adonovirus-TSE può servire a verificare se il tempo di incubazione dipende dal livello di PrP espressa. 4) I cannabinoidi interagiscono con la regolazione del tono motorio e coi sistemi dopaminergico e glutammatergico. L'alterazione di questi sistemi è alla base dei disordini del movimento che accompagnano le malattie neurodegenerative dello striato (Parkinson e corea di Huntington).

Risultati attesi nel triennio

Approfondire la conoscenza dei fattori genetici coinvolti nello sviluppo di AD, CJD e demenza fronto-temporale (FTD) in Italia. Identificazione di nuove famiglie e analisi genotipica per l'individuazione di mutazioni in geni noti associati a queste malattie o di nuovi geni. Definizione del rapporto tra mutazioni e/o polimorfismi e fenotipi clinici.

Miglioramento e messa a punto di nuovi sistemi per la diagnosi precoce clinica, strumentale e di laboratorio nelle malattie neurodegenerative.

Studio dei meccanismi di danno cerebrale: ruolo di ioni metallici, molecole pro e anti-ossidanti, peptidi amiloidogenici, cannabinoidi endogeni e distrobrevine nei processi di danno neuronale.

Sviluppo di modelli animali per lo studio delle malattie neurodegenerative mediante tecniche di ingegneria genetica o di modulazione farmacologica.

Terapia sperimentale: ruolo protettivo di neurotrofine, anticorpi intracellulari anti proteina prionica, molecole anti-apoptotiche virali e batteriche

Trasferibilità dei risultati

I risultati che ci proponiamo di ottenere con questo progetto potranno contribuire allo sviluppo delle metodiche diagnostiche cliniche e di laboratorio delle malattie neurodegenerative 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 il 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. Diffusione dei risultati ottenuti mediante pubblicazioni scientifiche, partecipazioni a congressi nazionali e internazionali.”

Studio del ruolo del virus Herpes Simplex-1 nella patogenesi della malattia di Alzheimer

L'esposizione cronica e persistente a fattori ambientali, tra cui alcuni agenti infettivi, è stata ampiamente descritta come possibile fattore di rischio per lo sviluppo della malattia di Alzheimer (AD). In particolare, l'ipotesi di un ruolo eziopatogenetico del virus *Herpes Simplex* di tipo 1 (HSV-1) è supportata da studi epidemiologici, che hanno evidenziato la presenza di materiale genetico di HSV-1 in un'alta percentuale di reperti autoptici provenienti da pazienti affetti da AD. Inoltre, numerose evidenze sperimentali dimostrano il coinvolgimento diretto di alcune proteine virali nei *pathway* cellulari che portano alla degenerazione neuronale tipica di AD.

Il presente progetto di ricerca si propone di verificare se l'infezione da HSV-1 delle cellule neuronali possa svolgere un ruolo cofattoriale nella patogenesi di AD, utilizzando modelli sperimentali di infezione *in vivo*. A tale scopo, virus HSV-1 *wild-type* o mutanti virali (deleti di geni codificanti per proteine erpetiche potenzialmente correlate allo sviluppo di AD), verranno iniettati bilateralmente nel nucleo basale del Meynert o nell'ippocampo, oppure inoculati sul piede e/o labbro di roditori per mimare la via naturale dell'infezione. In tutti gli animali saranno valutati i parametri biochimici (accumulo di peptide beta-amiloide, iperfosforilazione della proteina associata ai microtubuli tau e conseguente formazione dei grovigli neurofibrillari-NTF) e funzionali (alterazione della trasmissione e plasticità sinaptica) che caratterizzano AD.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio proposto permetterà di delineare il ruolo e i meccanismi con cui il virus HSV-1 può partecipare all'induzione degli eventi biochimici e funzionali che caratterizzano la malattia di Alzheimer. In particolare, sarà possibile valutare, negli animali infettati da HSV-1 *wild type* o mutato, i seguenti parametri:

l'attività della acetilcolintransferasi e il numero dei neuroni colinergici dei nuclei del telencefalo basale, mediante tecniche radiochimiche e immunoistochimiche;

le alterazioni della plasticità sinaptica a livello ippocampale, mediante tecniche elettrofisiologiche;

l'immunoreattività per il peptide beta-amiloide (Abeta) e la presenza di placche di Abeta nella corteccia e nell'ippocampo mediante tecniche di immunoistochimica che permetteranno di evidenziare l'eventuale formazione di depositi di Ab intra- o extra-cellulare;

la formazione eventuale di NFT nella corteccia e nell'ippocampo, mediante tecniche di immunoistochimica. Saranno utilizzati anticorpi diretti contro epitopi conformazionali o fosforilati della proteina associata ai microtubuli tau;

l'eventuale colocalizzazione intracellulare della proteina tau e di Abeta, mediante esperimenti di doppia marcatura immunoistochimica.

Trasferibilità dei risultati

La dimostrazione di un ruolo cofattoriale del virus HSV-1 nello sviluppo della malattia di Alzheimer permetterà di classificare l'infezione da HSV-1 come possibile fattore di rischio per alcune malattie neurodegenerative. In tal caso, essendo noto che circa il 90% della popolazione infettata da HSV-1 contrae l'infezione durante l'infanzia, il nostro progetto potrebbe 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, 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 dell'immunità innata e acquisita nell'infezione da micobatterio nel neonato e nell'adulto

La tubercolosi (TB) è responsabile di un numero di decessi estremamente elevato in tutto il mondo, e il numero di casi di TB pediatrica è in continuo aumento. Sebbene il vaccino BCG (batterio di Calmette-Gueren) induca risposte specifiche di tipo B e T nel neonato, le risposte protettive contro forme severe di malattia che esso induce sono limitate solo al primo anno di vita. C'è, pertanto un bisogno urgente di sviluppare un nuovo vaccino capace di indurre una protezione durevole dopo somministrazione in età infantile. Un approccio per affrontare questo problema consiste nel decifrare i meccanismi coinvolti nella risposta immune neonatale contro il micobatterio. Per questo, saranno sviluppati studi di comparazione della risposta immune innata e acquisita all'infezione tubercolare con particolare enfasi allo studio delle cellule dendritiche e dei linfociti T. Saranno studiati, a tale scopo, topi neonati e adulti, normali o KO per il gene ICSBP (un importante fattore di trasduzione del segnale, necessario per la maturazione delle DC), durante l'infezione con micobatterio e dopo inoculo con un nuovo e promettente composto vaccinale, l'HBHA (*mycobacterial heparin-binding hemagglutinin*) metilato. Lo studio prevede saggi *ex vivo* da tessuti murini e *in vivo* in topi immunodeficienti ricostituiti con linee cellulari emopoietiche linfoidi e mieloidi umane, permettendo di approfondire lo studio della immunità umana al micobatterio. Ulteriori studi saranno eseguiti su cellule dendritiche (DC) neonatali umane, derivate dal sangue del cordone ombelicale, sottoposte *in vitro* a diversi stimoli maturativi. In particolare sarà valutato il ruolo dell'interferon di tipo I nel determinare le condizioni ottimali di maturazione e differenziamento delle DC neonatali per la presentazione degli antigeni tubercolari ai linfociti T.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi proposti nell'ambito di questo progetto saranno svolti in collaborazione con il gruppo del prof. Martin Rottenberg del Karolinska Institutet (Stoccolma, Svezia) e altri *partner* europei. Il nostro laboratorio si occuperà di valutare:

Il ruolo del sistema dell'interferon di tipo I nell'ontogenesi delle DC del neonato rispetto all'adulto e nel differenziamento e maturazione durante la stimolazione con antigeni del micobatterio. I parametri utilizzati saranno: distribuzione e fenotipo dei vari *subsets* di DC; espressione dei *Toll-like receptors*; capacità di catturare e presentare antigeni tubercolari alle cellule T CD4+.

L'importanza del sistema ICSBP nella maturazione/differenziamento delle DC neonatali rispetto a quelle adulte. Per questa parte del progetto saranno studiati gli stessi parametri descritti nel punto precedente.

L'assetto fenotipico delle DC umane neonatali e la loro sensibilità a fattori differenziativi come l'interferon di tipo I per la presentazione di antigeni tubercolari come l'HBHA con il fine di definire la composizione e le modalità di somministrazione di un potenziale vaccino antitubercolare pediatrico ad efficacia illimitata.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio dei meccanismi dell'immunità innata alla tubercolosi in età neonatale fornisce importanti informazioni per la definizione di strategie vaccinali contro questa diffusa malattia. La caratterizzazione dell'attività di un nuovo antigene tubercolare modificato (HBHA) e la sua validazione come vaccino in modelli sperimentali e *in vitro* consentirà di fornire un nuovo strumento per la lotta alla tubercolosi, soprattutto in età pediatrica.

Studio della progressione temporale delle alterazioni neurocomportamentali di modelli murini di patologie degenerative, con particolare riferimento alla malattia di Parkinson (PD)

La malattia di Parkinson è caratterizzata dalla degenerazione progressiva del sistema dopaminergico nigrostriatale e dal parallelo deterioramento dell'individuo affetto con acinesia, rigidità, tremore e demenza. I trattamenti farmacologici oggi disponibili si limitano a controllare i sintomi motori, ma nessuno di questi è efficace nel prevenire o rallentare la progressione della malattia. Questa ricerca intende caratterizzare la progressione temporale delle alterazioni neurocomportamentali in diversi modelli murini di PD, con particolare attenzione ai segni precoci di danno degenerativo. Verranno utilizzati sia un modello patogenetico di ratto con lesione parziale dello striato e della substantia nigra (che presenta una progressione temporale piuttosto lenta, mimando le fasi iniziali della patologia umana), sia modelli transgenici disponibili commercialmente, nei quali sia possibile stabilire una correlazione tra alterazioni comportamentali precoci (inclusi i *deficit* emozionali e cognitivi) e la comparsa del fenotipo neurologico conclamato. Le alterazioni comportamentali precoci saranno correlate a indici neurochimici e elettrofisiologici, in collaborazione con altri gruppi ISS. Ciò consentirà da un lato l'identificazione di meccanismi patogenetici in fase precoce con la potenziale identificazione di nuovi *target* non esclusivamente dopaminergici per trattamenti farmacologici neuroprotettivi, dall'altro la validazione di indici precoci di danno neurodegenerativo, soprattutto relativi alla sfera cognitiva, attentiva e emotiva, attraverso i quali valutare l'efficacia di nuove strategie terapeutiche mirate a prevenire o ridurre la progressione della patologia. Questo secondo aspetto è anche rilevante per altre patologie neurodegenerative che colpiscono principalmente le funzioni motorie, quali la Sclerosi Laterale Amiotrofica.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di sintomi precoci utili alla diagnosi dei primi stadi della patologia, in una fase nella quale il potenziale intervento terapeutico possa risultare efficace nel ritardare la progressione e alleviare i sintomi che ledono maggiormente la qualità della vita del paziente.

Messa a punto di un modello animale (in specie di roditori che non comportano le problematiche bioetiche dei primati non umani) che presenti un quadro sindromico più simile alla condizione patologica umana di quelli attualmente disponibili e che consenta di identificare meccanismi patogenetici che precedono la degenerazione nigrostriatale.

Ricognizione a livello nazionale delle industrie farmaceutiche e biotecnologiche interessate allo sviluppo di agenti innovativi per contrastare le patologie neurodegenerative.

Diffusione della cultura scientifica sulle patologie degenerative finalizzata ad aumentare nel contesto socioculturale italiano l'accettazione sociale della condizione patologica, e in particolare delle alterazioni della sfera cognitiva e emotiva.

Trasferibilità dei risultati

Il valore traslazionale di questo progetto risiede nella caratterizzazione di alterazioni comportamentali precoci in modelli animali di PD, che riflettano le fasi iniziali della patologia umana, e che consentano la valutazione di nuovi approcci terapeutici finalizzati a bloccare o rallentare la progressione della malattia. Inoltre, l'identificazione di segni clinici precoci di

danno neurodegenerativo nell'animale, può fornire indicazioni sui domini comportamentali alterati nella fase iniziale della malattia e facilitare ai clinici la ricerca di analoghe alterazioni nel paziente, da utilizzare quali indicatori precoci sia diagnostici che prognostici

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

BORIS (“*Brother of the Regulator of Imprint Sites*”) è un gene recentemente descritto appartenente alla famiglia dei “*cancer testis*” (CT) e espresso esclusivamente durante gli eventi di riprogrammazione epigenetica nello sviluppo delle cellule germinali maschili. Dati preliminari indicano che BORIS risulta attivato in modo aberrante in una vasta varietà di tumori umani, laddove non è mai espresso in cellule somatiche normali. Queste caratteristiche rendono BORIS un antigene tumorale particolarmente attrattivo nello sviluppo di strategie di immunoterapia del carcinoma mammario, dei polmoni, della prostata e altre neoplasie. Numerosi studi suggeriscono il potenziale uso di cellule dendritiche (DC) in strategie vaccinali nel trattamento del cancro. Sebbene questi vaccini hanno mostrato un alto grado di sicurezza e una discreta attività, numerosi aspetti devono ancora essere definiti per ottimizzare il loro utilizzo in clinica. Recentemente, il nostro gruppo ha descritto e caratterizzato una nuova popolazione di DC, definita IFN-DC, generata da monociti umani dopo breve esposizione all'IFN di tipo I in coltura. Per le loro caratteristiche funzionali, le IFN-DC rappresentano uno strumento potenzialmente molto efficace nel modulare e potenziare la risposta immune contro il cancro. Il nostro gruppo ha, inoltre, una consolidata esperienza nell'utilizzo di modelli sperimentali murini per lo studio delle proprietà immunogeniche di antigeni tumorali e per la valutazione dell'efficacia di strategie vaccinali basate sull'utilizzo di cellule DC. In questo ambito, questo progetto è finalizzato a combinare la caratterizzazione immunologica di antigeni della proteina BORIS con lo sviluppo di un'efficiente strategia vaccinale basata sull'utilizzo di IFN-DC da proporre, sulla base di dati preclinici definiti, nel trattamento di pazienti con cancro positivi per l'espressione di BORIS.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo di questo progetto è quello di caratterizzare epitopi immunogenici dell'antigene tumorale BORIS e valutarne il potenziale uso in strategie di immunoterapia nel trattamento di pazienti con tumori positivi per BORIS come il cancro del colon, della mammella, dei polmoni, della prostata e altre neoplasie. A tale fine, questo progetto sarà diviso in due fasi sperimentali, qui di seguito brevemente descritte:

1. Identificazione di peptidi immunogenici dell'antigene tumorale BORIS riconosciuti da linfociti CD8+. Per lo svolgimento di questa parte del progetto sarà utilizzato l'approccio della *reverse immunology*. Brevemente, questo metodo si basa sulla selezione di peptidi proteici secondo la loro capacità di legare specificatamente molecole HLA-A2.1 and HLA-B7, che insieme sono espresse dal 60% della popolazione caucasica. Successivamente, l'immunogenicità di questi peptidi verrà testata rispetto alla loro capacità di indurre linfociti CD8+ specifici e citotossici verso cellule tumorali esprimenti BORIS, in vivo e in vitro. L'approccio sperimentale si avvale di topi transgenici per le molecole umane HLA-A*02.01 and *B7 per gli studi *in vivo* e di PBMC da donatori sani HLA-A*0201- and HLA-B*0702 per gli studi *in vitro*;

2. Caratterizzazione di un vaccino basato sull'utilizzo di IFN-DC caricate con peptidi immunogenici della proteina BORIS in topi SCID. Questa parte del progetto sperimentale è finalizzata a valutare se IFN-DC caricate con peptidi di BORIS, selezionati nella prima fase del progetto, sono capaci di indurre in topi SCID ricostituiti con PBL umani una risposta immune

primaria contro l'antigene tumorale BORIS, valutata in termini di produzione di anticorpi e espansione di linfociti CD8+ specifici per BORIS.

Trasferibilità dei risultati

Alla luce della decennale collaborazione con il laboratorio del prof. Morse all'NIH, questo progetto si prefigge di raggiungere importanti risultati nel campo dell'immunoterapia del cancro. Il gruppo del prof. Morse, a seguito di progetti già finanziati, sta attualmente continuando gli studi di caratterizzazione dell'espressione di BORIS in pazienti con una vasta varietà di tumori. Il nostro gruppo all'ISS, forte delle proprie competenze in campo immunologico e della potenzialità dei modelli sperimentali già ampiamente utilizzati in studi precedenti, svolgerà un lavoro complementare indirizzato alla caratterizzazione immunologica di BORIS. Il confronto e lo scambio di materiale d'informazione tra i due gruppi, permetterà di trasferire i dati preclinici in applicazioni cliniche. L'obiettivo finale è, infatti, utilizzare la proteina BORIS o suoi peptidi immunogenici, in strategie vaccinali basate sull'impiego di IFN-DC da utilizzare nel trattamento di pazienti con tumori positivi per BORIS. Alla luce di nuovi studi recentemente riportati che dimostrano il controllo trascrizionale di alcuni importanti CT da parte di BORIS, l'obiettivo di questo progetto si rivela di ancora più rilevante interesse e potenzialmente di forte impatto nel trattamento di pazienti con alcuni tipi di cancro.

Studio delle risposte agli agenti psicoattivi in funzione di fattori socio-ambientali e dello stress perinatale

Il progetto formalizza una serie di collaborazioni con: 1) il Reparto diretto dalla dr.ssa Franca Podo, Dipartimento BCN, ISS; 2) il Reparto diretto dal Prof. Umberto di Porzio, IGB-CNR, Napoli.

L'idea base del progetto è che l'infanzia e/o l'adolescenza possano rappresentare età a rischio, per via della elevata plasticità che ancora si riscontra a livello del sistema nervoso centrale. In particolare, l'esposizione in età infantile e/o adolescenziale a una serie di esperienze avverse potrebbe determinare delle modifiche a livello neurobiologico, che possono essere durevoli o addirittura permanenti. Tali esperienze avverse comprendono: condizioni di *stress* ambientale e/o sociale, psico-farmaci utilizzati in età evolutiva (es. metilfenidato nella ADHD, anti-psicotici nell'autismo e nella schizofrenia) e/o consumo di altre sostanze suscettibili di abuso. Inoltre, si ipotizza che gli effetti di tali esperienze avverse in età evolutiva siano di natura sostanzialmente diversa dagli effetti dovuti ad analoghe esposizioni in età adulta. Ciò comporta dei seri rischi per la salute pubblica, che ci si propone di studiare in modelli animali.

Risultati attesi nel triennio

Ci si propone di valutare, nel modello animale, il potenziale rischio di alterazioni neuro-comportamentali, persistenti a lungo termine, legate ad una esposizione in età precoce ad eventi avversi, quali *stress* socio-ambientale e/o psico-farmaci. Tale rischio sarà studiato tramite metodiche validate per l'analisi del comportamento animale, in particolare eventuali alterazioni prodotte nella sfera emotiva, affettiva, associativa, attenzionale e cognitiva. Tali analisi saranno affiancate dall'uso di tecniche avanzate, *in vivo* ed *ex vivo*, quali: 1) risonanza magnetica funzionale e/o spettroscopia (fMRI, MRS) in specifiche aree cerebrali; 2) *screening* genomico (*microarray* e RT-PCR) delle variazioni nei livelli di espressione genica in specifiche aree cerebrali. Lo studio, condotto a più livelli disciplinari (comportamentale, metabolico-neurologico, genetico-molecolare), permetterà di fornire un quadro completo e integrato delle variazioni indotte a breve termine, e delle eventuali conseguenze a lungo termine. Da questi dati potranno essere estrapolate informazioni utili circa i fattori di rischio, e per l'elaborazione di strategie di prevenzione per la salute pubblica.

Trasferibilità dei risultati

Il presente progetto, che si avvale di modelli animali di riferimento, consentirà di ottenere informazioni utili circa i determinanti biologici alla base delle manifestazioni di devianza neuro-comportamentale, osservabili nell'uomo in età evolutiva. L'interazione di vari approcci disciplinari fornirà un quadro più completo circa le conseguenze a breve e lungo termine, legate ad eventuali eventi avversi (*stress* sociale e/o ambientale, esposizione a trattamento con psicofarmaci e/o a sostanze psicoattive) durante la fase dell'infanzia e dell'adolescenza. In entrambe i casi, le informazioni prodotte saranno di carattere altamente innovativo, in quanto sia il contributo dei fattori socio-ambientali nella eziologia psichiatrica che la psico-farmacologia in età evolutiva sono temi sui quali poco è noto nella letteratura scientifica. Si prevede di continuare una intensa attività di divulgazione scientifica per studenti e professori in ambito scolastico, e presso operatori del SSN e di EPR.

Studio multidisciplinare di un modello genetico della Sclerosi Laterale Amiotrofica

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla morte selettiva dei motoneuroni spinali e del tratto cortico-spinale. La patologia si manifesta con una forma sporadica e una forma ereditaria che tuttavia presentano caratteristiche cliniche molto simili. Studi epidemiologici hanno evidenziato che il 20% dei casi familiari è caratterizzato da alcune mutazioni nel gene SOD1. Il presente studio multidisciplinare avviato sul modello transgenico murino, ha lo scopo di esaminare se la sovraespressione della SOD1 umana (hSOD) e della sua forma mutata (G93A), causa modificazioni: i) nel comportamento, ii) nell'espressione e funzionalità dei canali ionici di membrana; iii) nell'espressione proteica; iv) in modelli biofisici di funzionalità elettrica. In tale ambito è nostro interesse analizzare l'espressione dei geni coinvolti nella malattia di Alzheimer, nei modelli animali sopra citati di SLA, per verificare se la manipolazione genetica della SOD1 e la conseguente condizione di elevato stress ossidativo possano modulare l'espressione di tali geni. Un tale evento potrebbe infatti essere indicativo di meccanismi patogenetici comuni in grado di modulare i fenotipi di entrambe le malattie.

Risultati attesi nel triennio

Negli ultimi anni la ricerca scientifica si propone di evidenziare i tratti comuni delle più diffuse malattie neurodegenerative per comprendere se esistano analogie tra le diverse vie metaboliche e delucidare i meccanismi molecolari alla base dei processi patologici. I geni da noi studiati sono coinvolti nella via di processamento dell'APP e pertanto responsabili della produzione dei peptidi A-beta, elementi costitutivi delle placche amiloidi extracellulari, caratteristiche della malattia di Alzheimer. Il nostro studio è condotto sia a livello trascrizionale, che post-traduzionale su colture primarie di cellule corticali isolate dai topi transgenici, sui geni: APP, BACE1 (*beta-site APP cleaving enzyme*) che codifica l'enzima con attività beta-secretasica, PSEN1 (Presenilina 1) e PSEN2 (Presenilina 2), componenti della gamma-secretasi. I risultati finora ottenuti hanno evidenziato un incremento del messaggero sia dell'APP che di BACE1 nelle colture cellulari primarie isolate, già a livello embrionale, dai topi transgenici. Mentre, parallelamente, l'analisi effettuata sui geni PSEN1 e PSEN2 non ha mostrato alterazioni, nel ceppo G93A, rispetto al modello hSOD e al controllo murino. Inoltre, i dati preliminari ottenuti dall'analisi delle proteine APP, BACE1 e PSEN2 hanno evidenziato un pattern di espressione inatteso nelle cellule corticali, che potrebbe essere dovuto a meccanismi di regolazione proteica ancora da individuare.

Trasferibilità dei risultati

I risultati che ci proponiamo di ottenere con questo studio, potranno contribuire a meglio comprendere i meccanismi di base della Sclerosi Laterale Amiotrofica, contribuendo a rilevare quelle analogie esistenti tra le diverse vie metaboliche delle malattie neurodegenerative come la SLA e la malattia di Alzheimer.

Studio sulle interazioni tra cellule T gamma delta e cellule dendritiche nella regolazione della risposta immunitaria

In aggiunta alle cellule che presentano l'antigene, quali le cellule dendritiche (DC), le cellule T gamma delta rappresentano una popolazione cellulare importante dell'immunità innata. Diversi studi hanno chiaramente mostrato che queste cellule rivestono un ruolo importante nella sorveglianza immunitaria ai tumori e alle malattie infettive. Le cellule T gamma delta sono in grado di interagire funzionalmente con le DC e questa interazione porta ad una attivazione bidirezionale che potrebbe essere rilevante per la regolazione della risposta immunitaria. Sulla base di queste osservazioni, il presente progetto di ricerca si propone di studiare le interazioni funzionali tra cellule T gamma delta e DC, che presentano alterazioni funzionali indotte dal virus HIV o che sono state rese tollerogene mediante trattamento con la vitamina D3, un ormone la cui attività immunomodulatoria è ben conosciuta. L'attività proposta si svilupperà su 3 obiettivi principali: 1) Definire gli effetti diretti dell'esposizione delle cellule T gamma delta al virus HIV-1 o alla vitamina D3 sulla loro attivazione indotta da fosfo-antigeni; 2) Valutare gli effetti dell'esposizione delle cellule T gamma delta al virus HIV-1 o alla vitamina D3 sulla loro capacità di attivare le DC; 3) Caratterizzare gli effetti dell'esposizione di DC al virus HIV-1 o alla vitamina D3 sulla loro capacità di regolare l'attivazione delle cellule T gamma delta.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto contribuiranno ad aumentare le nostre conoscenze sulla biologia delle cellule T gamma delta, e in particolare su come le loro funzioni sono modulate in situazioni di tolleranza immunologica, quali quelle osservabili nel corso di infezioni virali o agenti immunosoppressivi. Inoltre, lo studio proposto fornirà informazioni importanti su diversi aspetti dell'interazione tra le cellule T gamma delta e le DC, e della loro reciproca attivazione, contribuendo quindi ad ampliare le nostre conoscenze sui meccanismi attraverso i quali la risposta immunitaria viene regolata.

Trasferibilità dei risultati

Utilizzo delle cellule T gamma delta come adiuvanti cellulari in protocolli di immuno terapia

Sviluppo di nuove piattaforme di *microarray* per l'analisi dell'espressione genica e di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in citochine e geni correlati come marcatori predittivi del decorso della malattia e della risposta a trattamenti terapeutici in pazienti con cancro o infezione virale

Negli ultimi anni, lo straordinario sviluppo della tecnologia dei *microarray* ha aperto nuove frontiere nella cura di molte malattie come il cancro, le malattie cardiovascolari e auto-immuni. In oncologia, i *microarray* hanno radicalmente cambiato lo studio delle basi genetico/molecolari delle neoplasie e hanno aperto nuove vie per rapidi progressi nella diagnosi e prognosi dei tumori e nella predizione della risposta alle terapie con la prospettiva di disegnare trattamenti terapeutici personalizzati. Di recente, variabilità genetiche interindividuali, come i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), hanno destato molto interesse per il loro possibile coinvolgimento nel determinare il decorso di molte malattie e la diversa risposta alle terapie. In pazienti oncologici, gli SNP attraverso il controllo dell'attività di citochine sembrano avere un ruolo importante nella risposta a trattamenti terapeutici che implica una risposta immune. I

microarray permettono oggi l'analisi simultanea di migliaia di SNP a costo relativamente contenuto, condizione necessaria per studi clinici. Dato l'enorme interesse e potenzialità dei *microarray*, il nostro gruppo ha promosso in ISS l'allestimento del "Centro di Ricerca Interdipartimentale dei *Microarrays*" (CRIM), che si avvale di un *team* di persone qualificate in grado di affrontare tutte le fasi dello studio che l'uso di questa tecnologia comporta. Attualmente è in corso lo sviluppo di piattaforme di DNA *microarray* per l'analisi di profili di espressione genica e di SNP di citochine che permetterà l'attuazione di collaborazioni scientifiche internazionali finalizzate a definire le basi genetico/molecolari della suscettibilità alla malattia e della risposta a trattamenti terapeutici in pazienti con cancro e infezioni virali.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo generale di questo progetto è lo sviluppo di nuove piattaforme di *microarray* per l'analisi di profili di espressione genica e di SNP di geni di citochine e molecole correlate allo scopo di identificare marcatori predittivi del decorso della malattia e della risposta a trattamenti terapeutici in pazienti con malattia oncologica o virale. Il piano sperimentale prevede 3 fasi principali:

1. realizzazione degli *oligo-chips* per l'analisi dei profili di espressione genica sulla base della banca *Human Genome Oligo Set-Version 3.0* (Operon);

2. disegno degli *oligo* per l'identificazione di SNP di geni di citochine e molecole correlate e realizzazione dei *chips* relativi sulla base di una nuova strategia sviluppata dal gruppo di F. Marincola (NIH, Bethesda). Questo approccio, particolarmente appropriato per studi clinici, permette uno *screening* semplificato delle regioni genomiche conservate e polimorfiche e consente di identificare rapidamente rari soggetti portatori di SNP di interesse;

3. realizzazione degli studi di espressione genica e di analisi di SNP di citochine in coorti di pazienti oncologici o con infezioni virali sottoposti a terapia nell'ambito di collaborazioni scientifiche europee in via di attivazione. Sono previsti i seguenti studi clinici: (i) pazienti con melanoma trattati con chemio-immunoterapia e IFN (Proietti E./Belardelli F., Italia); (ii) pazienti con melanoma sottoposti a terapia con imiquimod/resiquimod (Hengge U., Germania); (iii) pazienti con epatite C sottoposti a terapia con IFN (Rihn B., Francia); (iv) pazienti con carcinoma mammario sottoposti a chemioterapia/terapia endocrina (Sotiriou C., Belgio); (v) pazienti con leucemia acuta trattati con IL-2 (Foà R., Italia); (vi) pazienti con leucemia linfoide cronica (Piris M., Spagna).

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione del presente progetto permetterà di sviluppare nuove piattaforme di DNA *microarray*, e successivamente di *microarray* proteici, per studi di espressione genica e per l'analisi di SNP di citochine e di geni correlati. Queste piattaforme rappresenteranno strumenti innovativi, versatili, di grande potenzialità e di costo contenuto da utilizzare in studi complessi quali quelli clinici. In loro utilizzo permetterà di identificare parametri genetici/molecolari, e eventualmente proteici, alla base di differenze interindividuali responsabili del decorso clinico della malattia e della diversa risposta a trattamenti terapeutici in pazienti con malattia oncologica o virale. La partecipazione a questo progetto di gruppi strategici nella ricerca oncologica in Europa, permetterà la verifica dei risultati raggiunti nel contesto di studi multicentrici.

Inoltre, il raggiungimento di tali obiettivi, reso possibile grazie all'attivazione del CRIM e delle collaborazioni scientifiche nazionali e internazionali avviate in questo ambito, permetterà di estendere questo progetto a studi clinici più ampi per una valutazione su larga scala dei dati raggiunti.

Sviluppo e ottimizzazione di procedure compatibili con l'uso clinico per la preparazione di cellule dendritiche differenziate in presenza di interferone-alfa

L'impiego delle cellule dendritiche (DC) quali adiuvanti cellulari di vaccini terapeutici contro il cancro attrae attualmente un grande interesse e la definizione di protocolli per la generazione di DC "ottimali" è un obiettivo principale della ricerca nel settore dell'immunoterapia del cancro. Il nostro gruppo ha sviluppato un metodo per la rapida generazione di DC mediante coltivazione di monociti umani con GM-CSF e IFN-alfa (IFN-DC) (brevetto PCT/EP02/04709). In diversi modelli sperimentali, le IFN-DC si sono dimostrate particolarmente potenti nell'indurre risposte immuni di tipo Th1 e linfociti T CD8+ specifici per antigeni tumore-associati. Questi risultati hanno portato all'avvio, in collaborazione con l'industria Immuno-Design Molecules (IDM) che ha sviluppato una metodologia già approvata per la preparazione di DC per uso clinico, di una sperimentazione finalizzata alla validazione di procedure per la preparazione di IFN-DC per uso clinico, e alla valutazione comparativa delle proprietà delle IFN-DC con DC di riferimento. Tale attività è finanziata nell'ambito del progetto "Therapeutic Cancer Vaccines" (2004-2007), coordinato da IDM e finanziato dalla UE (VI Programma Quadro), che ha l'obiettivo di ottimizzare i protocolli e standardizzare le condizioni per la preparazione di vaccini antitumorali basati su DC e di avviare uno studio comparativo di vaccinazione di pazienti con carcinoma della prostata con l'antigene EpCAM caricato su DC o formulato in liposomi.

Risultati attesi nel triennio

I risultati appresso indicati si inseriscono in uno degli obiettivi generali del progetto europeo "Therapeutic Cancer Vaccines" sopra citato che consiste nella ottimizzazione dei processi per la generazione di DC da utilizzarsi nella preparazione di vaccini antitumorali. Tale obiettivo appare di particolare rilievo se si considera che uno degli aspetti critici, su cui attualmente si concentrano gli sforzi di molti gruppi di ricerca, riguarda l'identificazione di protocolli per la generazione di DC dotate delle caratteristiche funzionali "ottimali" per l'induzione di una risposta antitumorale protettiva.

I risultati attesi dell'attività descritta sono:

Definizione e validazione di procedure compatibili con l'uso clinico per il differenziamento, la attivazione/maturazione, la crio-conservazione di IFN-DC da utilizzarsi come adiuvanti di vaccini antitumorali.

Valutazione in sistemi *in vitro* dei possibili vantaggi dell'uso di IFN-DC rispetto a DC di riferimento per lo sviluppo di vaccini da utilizzarsi in pazienti oncologici.

Valutazione della capacità delle IFN-DC di indurre una risposta linfocitaria diretta contro l'antigene tumore-associato EpCAM.

Utilizzo dei risultati degli studi di ottimizzazione per il disegno di protocolli di vaccinazione di pazienti con carcinoma della prostata.

Trasferibilità dei risultati

I risultati degli studi descritti consentiranno di acquisire conoscenze sulla "potenza" funzionale relativa di DC ottenute con diversi metodi. L'importanza e la necessità di studi dedicati alla comparazione di diversi tipi di DC e alla standardizzazione dei metodi per la produzione di DC per uso clinico è stata più volte sottolineata a livello internazionale dagli sperimentatori, a fronte dell'eterogeneità dei tipi di DC utilizzati negli studi clinici finora condotti. Ci si attende inoltre che i risultati porranno le basi per sperimentazioni cliniche volte a verificare la sicurezza e l'efficacia immunologica di nuovi vaccini antitumorali basati sull'uso di IFN-DC. L'attuazione di tali studi clinici sarà fortemente facilitata dall'attivazione in ISS di un centro dotato di strutture per la produzione di cellule in condizioni GMP per uso clinico, così

come dalla partecipazione a progetti europei (“*Therapeutic Vaccines for Adenocarcinomas*”, sottomesso da IDM alla UE nel novembre 2005).

Tackling the problem of rare diseases yet lacking adequate diagnosis

L'importanza di una diagnosi precoce e accurata non può essere trascurata quando si considerano le malattie rare, dal momento che queste due caratteristiche rappresentano le basi per un trattamento specifico e, dove possibile, per effettuare interventi di prevenzione. Inoltre, mutazioni diverse sullo stesso gene concorrono allo sviluppo di un quadro clinico e prognostico diverso. In molti casi è necessario caratterizzare in maniera completa il quadro genotipico e fenotipico.

L'accertamento diagnostico rappresenta sicuramente un enorme beneficio offerto al paziente e alla sua famiglia.

Obiettivo prioritario del progetto è sviluppare strumenti diagnostici per malattie molto rare o per quelle condizioni per le quali manca ancora una adeguata diagnosi. Per ciascuna patologia in esame ciò sarà raggiunto mediante a) lo studio e la comprensione delle basi molecolari; b) l'elaborazione e validazione analitica di specifici test genetici; b) valutazione dell'utilità clinica del test.

Risultati attesi nel triennio

caratterizzazione e, laddove possibile, inquadramento diagnostico di forme cliniche non meglio diagnosticate.

studio e caratterizzazione delle basi molecolari di malattie molto rare selezionate.

sviluppo di nuovi approcci e criteri di valutazione da impiegare nello sviluppo di nuovi test genetici.

Trasferibilità dei risultati

organizzazione di un *network* per ricerche clinico-sperimentali sulle malattie rare che comprenda anche la formazione di ricercatori;

organizzazione di una struttura per la raccolta informazioni, consulenza e valutazione diagnostica riguardo ai pazienti affetti da malattie molto rare o con condizioni non diagnosticate;

organizzazione di conferenze scientifiche per approfondire temi specifici;

realizzazione di Convegni e *workshop* coinvolgendo il mondo dell'associazionismo;

diffusione di informazioni ai ricercatori, agli operatori sanitari, ai cittadini.

Task Force in Europe for Drug Development for the Young (TEDDY). WP5: Rare diseases and orphan drugs

TEDDY è un *network* di eccellenza, finanziato dalla Commissione EU (DG-Research), il cui obiettivo primario è l'ottimizzazione dei farmaci correnti e lo sviluppo di farmaci nuovi in pediatria. A tale scopo, notevole importanza viene data alle applicazioni della farmacogenetica e farmacogenomica, all'elaborazione di linee guida, alla variabilità di risposta legata al sesso e allo sviluppo, dal periodo prenatale all'adolescenza. Saranno studiati gli effetti avversi e i problemi legati alla stima del dosaggio dei farmaci nuovi. Per i farmaci in commercio saranno resi disponibili database armonizzati. Saranno organizzati corsi su argomenti specifici (es. specifici temi, etica). TEDDY coinvolge ricercatori, clinici, agenzie regolatorie, Associazioni dei pazienti e altri network europei impegnati nei *trial* clinici in pediatria (PENTA, PRINTO). L'ISS oltre a partecipare agli studi sopradetti, insieme con gruppi esterni, con impegni precisi (farmacologia di genere, farmacocinetica e farmacodinamica in pediatria, farmacologia del dolore) coordina il WP5: Malattie rare e farmaci orfani in pediatria. Le malattie rare

costituiscono un problema di sanità pubblica in Europa e lo sviluppo di farmaci orfani in età pediatrica costituisce una priorità. Obiettivi del WP5: a) raccogliere le informazioni esistenti nel settore; b) supportare lo sviluppo e la disponibilità di farmaci orfani innovativi, sicuri e efficaci, anche mediante lo studio dei meccanismi molecolari di specifiche malattie.

Risultati attesi nel triennio

Risultati a breve termine:

- Accertamento della disponibilità di farmaci orfani in pediatria nei vari Paesi EU;
- Sviluppo di linee guida per garantire disponibilità di farmaci efficaci;
- Sviluppo di linee guida per trials clinici in specifiche malattie rare, considerando i piccoli numeri.

Risultati a lungo termine:

- Facilitazione dello sviluppo di prodotti medicinali orfani mediante la farmacogenetica e farmacogenomica;
- Elaborazione di linee guida per effettuare un'accurata diagnosi per migliorare l'approccio terapeutico;
- Collaborazione e integrazione con il Network NEPHIRD (European Network of Public Health Institutions on Rare Diseases).

Trasferibilità dei risultati

Linee guida diagnostiche per malattie rare e linee guida terapeutiche per prodotti medicinali orfani, con armonizzazione di protocolli per tutti i Paesi EU.

Potenziamento e accessibilità del Registro nell'ambito EU per gli effetti avversi e la farmacovigilanza in ambito Malattie rare.

Protocolli e corsi di formazione in farmacologia pediatrica per operatori del settore sia per discipline farmacologiche (farmacocinetica, farmacodinamica, modelli innovativi di studi clinici e preclinici) sia per discipline organizzative ed etiche (terapia del dolore a tutti i livelli, sostegno psicologico, sostegno del paziente terminale e dei familiari).

Trasferimento nel settore delle malattie rare di tutte le applicazioni emerse dagli studi delle peculiarità della farmacologia di genere.

Test genetici: dalla ricerca alla clinica

Negli ultimi anni il forte incremento delle conoscenze scientifiche ha contribuito alla migliore comprensione delle basi molecolari delle malattie; ciò ha portato allo sviluppo e disponibilità di nuovi *test* genetici. Nell'immediato futuro, il numero dei *test* è destinato ad aumentare, non solo per diagnosticare malattie monogeniche ma per stabilire la suscettibilità verso patologie multifattoriali (es. malattie cardiovascolari, cancro, diabete). Nell'ambito di questo progetto di ricerca, lo studio a livello molecolare di alcune patologie rare a instabilità cromosomica è indirizzato alla comprensione dei meccanismi patogenetici e alla generazione di nuovi *test* genetici per ottimizzarne la diagnosi. In particolare, la sindrome di Nijmegen ha reso possibile l'acquisizione di conoscenze sui meccanismi biologici che sono alla base del danno a livello del DNA e dello sbilanciamento genico, anche attraverso lo studio dell'espressione genica.

Inoltre, un obiettivo importante del progetto è la valutazione della qualità dei laboratori che eseguono *test* genetici attraverso un sistema di assicurazione di qualità.

Risultati attesi nel triennio

Pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali sulle patologie studiate;

Possibile sviluppo di nuovi *test* genetici, derivanti dalla ricerca, per una diagnosi più precisa e soprattutto più rapida per alcune malattie rare;

Monitorare e migliorare la qualità dei laboratori che utilizzano *test* genetici nella diagnostica molecolare delle malattie rare;

Elaborazione di protocolli standardizzati e validati e di linee guida per la gestione dei *test* genetici;

Organizzazione di Corsi e *Workshop* su argomenti specifici del progetto.

Possibile sviluppo di nuovi *test* genetici, derivanti dalla ricerca, per una diagnosi più precisa e soprattutto più rapida per alcune malattie rare.

Trasferibilità dei risultati

Raccomandazioni e linee guida per un sistema di assicurazione di qualità nei laboratori che eseguono *test* genetici;

Test genetici validati per la diagnosi di patologie genetiche e valutazione di appropriatezza nel percorso diagnostico di questi;

Protocolli innovativi e standardizzati per l'analisi mutazionale di geni malattia;

Allestimento di una banca di linee cellulari linfoblastoidi portatrici di geni mutati, necessaria all'esecuzione dei controlli di qualità.

The efficacy of folic acid for primary prevention of birth defects

L'acido folico rappresenta un importante fattore nella riduzione del rischio di difetti congeniti e in particolare dei difetti del tubo neurale. La carenza di folati e/o le alterazioni del loro metabolismo sono causati da eventi multifattoriali da valutare tenendo conto degli aspetti nutrizionali, tossicologici, clinici e genetici.

Il Progetto è volto a incrementare le conoscenze scientifiche circa la prevenzione di difetti congeniti connessi con il metabolismo dei folati. In particolare, si intende studiare e analizzare i) prevenzione di difetti del tubo neurale e di altri difetti quali, ad esempio, cardiopatie congenite e labiopalatoschisi; ii) polimorfismi genetici (enzimi o recettori coinvolti nel metabolismo dei folati); iii) possibile ruolo di alcune alterazioni del metabolismo (febbre, intolleranza al glutine) associate con l'aumento di richiesta di acido folico; iv) fattori ambientali che, interagendo con il metabolismo dei folati, contribuiscono allo sviluppo di difetti congeniti; v) possibili effetti negativi della assunzione di alte dosi di folati, con particolare attenzione all'aumento di parti gemellari.

Risultati attesi nel triennio

Miglioramento delle conoscenze scientifiche sui meccanismi d'azione dell'acido folico

Linee guida e/o raccomandazioni sulla prevenzione dei difetti del tubo neurale attraverso l'uso di acido folico, specifiche per operatori sanitari e donne in età fertile

Linee guida per la valutazione dei livelli di assunzione da parte della popolazione generale

Trasferibilità dei risultati

Banca dati per la valutazione di benefici derivanti dall'assunzione di acido folico per la prevenzione di difetti congeniti.

Banca dati per identificare fasce di popolazione a rischio in quanto maggiormente suscettibili ad interazioni del metabolismo dei folati.

Traffico intracellulare di molecole in cellule umane di interesse immunologico e oncologico

Questo progetto rappresenta la naturale prosecuzione di studi sul traffico di segnali, molecole e organelli citoplasmatici e loro relazione con componenti del citoscheletro, a seguito di attivazione recettoriale o di contatti intracellulari con bersagli tumorali sensibili.

In particolare, nel prossimo triennio sarà interessante:

approfondire lo studio sui meccanismi con cui la cellula Natural Killer (NK) umana discrimina la cellula normale dalla cellula che ha subito una infezione virale o batterica oppure che ha subito una trasformazione neoplastica.

isolare e caratterizzare l'enzima fosfolipasi C specifica del ciclo della fosfatidilcolina (PC-PLC) da cellule umane normali e/o tumorali.

Produrre nuovi reagenti specifici diretti contro l'enzima di mammifero. Gli esperimenti fin qui condotti hanno permesso di localizzare la PC-PLC in vari compartimenti cellulari quali il nucleo, i granuli litici, le vescicole e la membrana plasmatica. Proseguiranno pertanto i tentativi di produrre reagenti specifici in grado di discriminare le varie isoforme e quindi di indagare il ruolo funzionale svolto da ciascuna.

studiare il traffico di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale e/o nella presentazione di antigeni in associazione con molecole HLA di classe I e II. In questo contesto verranno completati gli esperimenti volti a chiarire: a) la(e) via(e) che porta l'antigene associato al tumore del colon-retto, COA-1 ad essere presentato in classe II a linfociti T CD4+ specifici; b) il *trafficking* intracellulare dei recettori tirosin kinasici (ErbB-2, EGFR) associati al tumore della mammella.

Risultati attesi nel triennio

Ruolo della PC-PLC nella formazione della sinapsi immunologica in cellule NK.

Isolamento e clonaggio di isoforme dell'enzima PC-plc di mammifero.

Produzione di anticorpi monoclonali diretti contro l'enzima di mammifero.

Chiarire la via di traslocazione mediante la quale l'antigene COA-1 viene presentato ai linfociti T CD4+.

Ruolo della PC-PLC nell'espressione dei recettori ErbB-2 e EGFR in tumori mammari umani.

Trasferibilità dei risultati

Chiarire il ruolo della PC-PLC nei processi litici delle cellule citotossiche umane (NK, CTL) sarà di grande utilità per capire i meccanismi alla base di alcune gravi patologie umane legate alla mancata funzionalità delle cellule NK e CTL.

L'isolamento e il clonaggio della PC-PLC di mammifero, insieme alla conseguente produzione di anticorpi monoclonali, permetteranno, di valutare l'importanza di questo enzima nella progressione tumorale.

Chiarire le vie di traslocazione dell'antigene tumorale COA-1 che percorre per essere presentato ai linfociti T CD4+ al fine di evocare una risposta immunologica significativa nei carcinomi del colon-retto.

Gli studi sul *trafficking* di recettori tirosin kinasici ErbB-2 e EGRF potrebbero suggerire nuove strategie diagnostiche sul tumore mammario.

Trasporto intracellulare, trasduzione del segnale e sviluppo del sistema nervoso: ruolo multifunzionale del complesso di proteine associato alla distrofina

Mutazioni in diverse componenti del complesso di proteine associato alla distrofina (DPC), un complesso multifunzionale che lega la matrice extracellulare al citoscheletro ed è coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale, portano allo sviluppo di varie forme di distrofia muscolare. Il DPC è localizzato anche nel cervello, e il fatto che circa un terzo dei pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne mostra un *deficit* intellettuale e disturbi cognitivi indica un suo coinvolgimento nelle funzioni cerebrali.

L'obiettivo del progetto è contribuire a chiarire le interazioni e il ruolo dei complessi DPC nel sistema nervoso in situazioni fisiologiche e patologiche. La distrobrevina, una delle componenti del DPC, potrebbe rivestire un ruolo particolare in questo contesto. Nel nostro

laboratorio, attraverso lo *screening* di una libreria di cDNA da cervello di topo, abbiamo identificato diverse proteine associate alla distrobrevina. Poiché l'interazione tra due proteine implica la possibilità che esse siano coinvolte nelle stesse funzioni cellulari, i risultati preliminari ottenuti suggeriscono che la distrobrevina possa giocare un ruolo non solo nel DPC, ma anche in altre strutture e processi fondamentali per la cellula.

Risultati attesi nel triennio

Considerando la sua associazione con la chinesina, in un primo progetto ci proponiamo di ottenere risultati che chiariscano il ruolo della distrobrevina nel trasporto intracellulare di componenti del DPC e di proteine ad essi associate.

L'interazione della distrobrevina con una sub-unità regolatoria della proteina chinasi AMPc-dipendente (PKA) lascia pensare che la distrobrevina sia un'AKAP (*A Kinase Anchoring Protein*), cioè una piattaforma molecolare per chinasi, fosfatasi e fosfodiesterasi. Un secondo progetto, che prevesse lo studio del ruolo della distrobrevina sotto questo aspetto, sarà utile ad una comprensione più approfondita dei meccanismi di trasduzione del segnale.

Un *partner* della distrobrevina è anche la pancortina, una glicoproteina specifica dei neuroni della corteccia cerebrale la cui espressione sembra correlata alla neurogenesi. L'analisi dell'interazione con la pancortina, insieme a quella con altre proteine che sembrano cruciali per il differenziamento neuronale, consentirà di valutare quale sia il ruolo della distrobrevina nei processi di sviluppo e differenziamento del sistema nervoso.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno inviati per la pubblicazione a riviste internazionali, e aiuteranno a chiarire il ruolo del DPC, e in particolare della distrobrevina, nel trasporto intracellulare, nella trasduzione del segnale e nel differenziamento neuronale. L'identificazione e la caratterizzazione delle proteine che interagiscono con il DPC contribuirà alla comprensione della patogenesi dei disordini muscolari e neurologici associati alla distrofia muscolare, e potrebbe aiutare alla messa a punto di terapie appropriate.

Validation of removal of mouse-adapted human variant CJD infectious prions from red cell concentrates using pall leukotrap affinity prion reduction filter

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo (malattia di Creutzfeldt-Jakob, MCJ) e gli animali (scrapie, encefalopatia spongiforme bovina, BSE). Le EST hanno lunghi tempi di incubazione in cui l'infezione non è rilevabile, ma il soggetto può trasmettere l'agente patogeno (comunemente definito prione), come ha dimostrato la recente identificazione di due episodi di trasmissione attraverso trasfusione della variante di MCJ nel Regno Unito. Questo episodio sottolinea l'urgenza di approfondire le ricerche relative alla messa a punto di nuovi sistemi di eliminazione dei prioni dai prodotti biologici.

A questo scopo abbiamo deciso, in collaborazione con l'azienda produttrice, di analizzare la capacità dei filtri Pall Leukotrap[®] di rimuovere l'agente della variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob murina da un concentrato di emazie contaminato intenzionalmente con alte dosi di questo agente infettante.

Lo studio prevede lo svolgimento di un esperimento durante il quale un omogenato cerebrale di topi infettati con il ceppo sperimentale di variante di malattia di Creutzfeldt-Jakob sarà mescolato a concentrato di emazie umane e subirà il processo di filtrazione con i filtri Pall Leukotrap. Le diverse frazioni pre e post filtrazione saranno raccolte e sottoposte al protocollo di estrazione e analisi mediante Western blot per valutare la riduzione nel contenuto di PrPSc.

Risultati attesi nel triennio

Questo studio consentirà di mettere a punto di un sistema di trattamento di emoderivati che possa contribuire a innalzare il livello di sicurezza di questi prodotti nei confronti delle malattie da prioni e in particolare dalla variante di malattia di Creutzfeldt-Jakob.

Trasferibilità dei risultati

Le misure di precauzione adottate dai governi per arginare la diffusione delle malattie da prioni attraverso l'uso di prodotti di origine biologica e in particolare di sangue e emoderivati sono già in grado di garantire un buon livello di sicurezza di questi prodotti, tuttavia la piena aderenza a queste norme è difficile da ottenere, inoltre, il lungo tempo di incubazione e la mancanza di sistemi diagnostici precoci impedisce di identificare tra la popolazione non a rischio i donatori infetti. Pertanto, sarebbe fondamentale poter disporre di trattamenti in grado di ridurre l'eventuale infettività presente nel sangue come quello che proponiamo di studiare in questo progetto. L'ISS svolge un ruolo di primo piano nell'ambito della sorveglianza, del controllo e della ricerca sulle malattie da prioni e dunque la sua partecipazione al progetto rientra a pieno titolo negli ambiti di studio, controllo e prevenzione svolti istituzionalmente per la tutela della salute pubblica

Valutazione dell'effetto antiblastico del farmaco ST-DS 2323 in modelli cellulari e animali

È noto che le tecniche MR di Immagine e Spettroscopia (MRI e MRS) possono contribuire al monitoraggio dell'efficacia terapeutica in tumori di farmaci innovativi non solo mediante l'analisi morfologica ma anche grazie a informazioni metaboliche correlate ai processi di inibizione della crescita. Sono riportate in letteratura numerose evidenze sperimentali che la cellula neoplastica presenta delle alterazioni peculiari del metabolismo lipidico e glucidico che la rendono un *target* specifico all'azione del farmaco in studio. ST-DS2323 (Sigma Tau, Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A. Roma) rappresenta il capostipite di una serie di composti che mostrano un'attività di inibizione della beta-ossidazione mitocondriale attraverso l'azione di blocco di un enzima specifico. Studi preliminari, presso diversi centri di ricerca, hanno evidenziato un'azione di questo farmaco sul blocco della crescita tumorale in diversi modelli *in vitro* e *in vivo*, sebbene il meccanismo d'azione non sia stato attualmente completamente delucidato. Questo progetto si propone di monitorare l'efficacia del composto ST-DS2323 in differenti linee cellulari tumorali e in modelli di tumori sperimentali.

Risultati attesi nel triennio

Si utilizzeranno opportuni modelli cellulari, un modello murino di carcinoma del polmone di Lewis ottenuto dall'inoculo sottocute di cellule LLC/2 nel topo C57Bl/6J e un modello murino di Leucemia a cellule T nel topo transgenico Notch3-IC (in collaborazione con Università la Sapienza di Roma). Questa ricerca ha lo scopo di valutare il significato di parametri MRI e MRS e di associarli allo studio degli effetti indotti dal trattamento sulla inibizione della crescita in relazione alla progressione del ciclo cellulare, alterazioni della morfologia cellulare e meccanismi di induzione di morte cellulare. Verranno, inoltre, valutati gli effetti sullo sviluppo di metastasi nel polmone, fegato, reni, muscolo scheletrico e cuore.

Trasferibilità dei risultati

Qualora i risultati dello studio indicassero efficacia del farmaco sui sistemi studiati, il nostro studio potrà contribuire ad un futuro uso clinico del composto ST-DS2323. In particolare, peculiarità del nostro contributo nello studio sarà l'identificazione di parametri MR della risposta del sistema tumorale al trattamento. Le tecniche *in vivo* di MR possono rappresentare una potenzialità per la valutazione futura non invasiva dell'efficacia della terapia in clinica e contribuire al *follow-up* dei pazienti sottoposti a protocolli di trattamento.

Valutazione *in vitro* della biocompatibilità dei sostituti artificiali del corpo vitreo

I biomateriali sono componenti non-biologici dei dispositivi medici, disegnati con il fine di interagire con il corpo umano senza produrre una reazione avversa. Questa proprietà è generalmente valutata *in vivo*. Dal momento che i biomateriali interagiscono con un solo tessuto o organo, modelli *in vitro* per la valutazione della biocompatibilità potrebbero essere utilizzati con maggiore successo rispetto ad altri prodotti, come i farmaci, che interagiscono invece con l'intero organismo. Questo progetto si propone di redigere un protocollo sperimentale una più efficiente valutazione *in vitro* dei biomateriali, focalizzato allo studio dei sostituti artificiali del corpo vitreo (SAV).

La formulazione del protocollo si basa su alcuni presupposti fondamentali:

i modelli *in vitro* dovranno mimare quanto possibile le condizioni *in situ*. Quindi il modello cellulare sarà scelto coerentemente con il tessuto con il quale i biomateriali saranno in contatto. Per i SAV, saranno utilizzate colture primarie di retina;

i *test* da effettuare saranno ordinati in stadi successivi, ordinati gerarchicamente, cominciando con i più semplici, meno costosi, per finire con i più complessi e sofisticati; solo se un materiale supera uno stadio, passa al successivo; in questa maniera i materiali non biocompatibili ai primi *test* sono eliminati dal protocollo, con risparmio di tempo e danaro.

i *test* saranno assemblati in un *kit* per l'utilizzo in laboratorio.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di rendere più efficace la sperimentazione *in vitro* della biocompatibilità dei materiali per uso medico, con vantaggi di varia natura quali:

riduzione della sperimentazione animale: tale obiettivo è in linea con la Direttiva 86/609/EEC, riguardante la protezione degli animali usati nella sperimentazione e per altri scopi scientifici e con il protocollo annesso al Trattato di Amsterdam riguardante il benessere degli animali;

riduzione della spesa per l'accertamento della biocompatibilità: un efficiente sistema di valutazione *in vitro* della biocompatibilità permette di ridurre il numero di composti che arrivano alla sperimentazione animale;

miglioramento della salute dell'uomo: la sperimentazione *in vitro* può chiarire la patogenesi di alcuni effetti collaterali descritti nell'uso clinico di biomateriali, che non erano stati previsti sulla base dei risultati della sperimentazione *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

Dopo la definizione e sperimentazione del protocollo, i vari *test* saranno assemblati in un *kit*. L'obiettivo finale è lo sviluppo di uno strumento tecnologicamente avanzato, ma *user-friendly*, dove quindi l'efficacia del risultato si accorda alla maneggevolezza e alla facilità d'uso, per garantirne un'ampia applicazione.

**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'Istituto Superiore di Sanità 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 del l'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 a 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 2003-2005 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:

specialità medicinali;

dispositivi medici;

sicurezza sangue e suoi derivati;

certificazioni di farmaci;

eventuali interrogazioni parlamentari;

pareri richiesti da vari Ministeri

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

Il Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti (RNIC) 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 è affidato all'ISS. In Italia la realizzazione di un programma su scala nazionale per la prevenzione delle le 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. Dal 1995 la totalità dei nati in Italia viene sottoposta a screening grazie all'esistenza di 26 Centri di *Screening* 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 l'RNIC. Il Registro infatti, è una struttura epidemiologica che realizza la continua e completa raccolta, registrazione, conservazione e 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.

Il Registro Nazionale degli Assuntori di Ormone della Crescita è operativo in Istituto sulla base di un DM del 29 novembre 1993, che ha introdotto disposizioni volte a regolamentare la prescrizione di specialità medicinali a base di ormone somatotropo, detto anche ormone della crescita o HGH, al fine di evitare che un uso incontrollato delle stesse potesse determinare situazioni di pericolo per la salute pubblica e spreco di risorse. Un DM del 29 novembre 1993 ha stabilito che l'HGH dovesse essere somministrato solo ai soggetti con *deficit* accertato di tale ormone, inclusi i pazienti con sindrome di Turner, e che la prescrizione di tale farmaco potesse essere attuata solo da centri regionali abilitati (presidi sanitari delle ASL, centri universitari o ospedalieri di endocrinologia elencati nella GU n. 165 del 16/07/1994). Negli anni successivi, il Ministero della Salute ha dato incarico alla Commissione Unica del Farmaco (CUF) di classificare i medicinali autorizzati all'immissione in commercio, per l'individuazione di quelli che possono essere erogati a totale o parziale carico del Servizio Sanitario Nazionale. La CUF ha, quindi, adottato note relative alla prescrizione e al controllo delle confezioni di alcuni medicinali inquadrandoli in classi a totale o a parziale rimborsabilità da parte del Servizio Sanitario Nazionale (classi A e B). Queste disposizioni vengono periodicamente aggiornate e attualmente sono in vigore le note CUF/AIFA 2004 che, relativamente alla prescrizione di medicinali a base di ormone della crescita, con la nota 39 stabiliscono i criteri diagnostici per i centri autorizzati e il flusso di informazioni sulle prescrizioni effettuate alle autorità regionali e da queste, annualmente, all'Istituto Superiore di Sanità. Il sistema di archiviazione delle schede di segnalazione pervenute è stato informatizzato, allo scopo di rendere utilizzabile l'intero database del Registro e di poter così fornire un più moderno strumento di verifica anche relativamente agli anni passati.

Piano triennale

Nell'ambito della programmazione triennale 2006-2008 le attività di controllo relative al coordinamento del Registro Nazionale degli Ipotiroidi Congeniti riguarderanno fondamentalmente la sorveglianza dell'Ipotiroidismo Congenito sull'intero territorio nazionale con particolare attenzione all'analisi delle fluttuazioni spazio-temporali della patologia in Italia. Verrà inoltre valutata l'efficienza delle procedure di *screening*, 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.

L'attività del Registro Nazionale degli Assuntori dell'Ormone della Crescita sarà indirizzata a realizzare e gestire la piattaforma comune cui avranno accesso le gestioni locali, 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. A tale scopo saranno organizzate incontri nazionali, riunioni a livello locale e corsi di addestramento del personale responsabile dell'inserimento delle segnalazioni sul registro informatizzato. Il Registro Nazionale provvederà ad elaborazione periodiche delle segnalazioni ricevute, che saranno comunicate ai centri prescrittori, alle Regioni e alle Società Scientifiche attraverso mezzi di diffusione quali comunicati, articoli scientifici e comunicazioni a congressi nazionali e internazionali.

Designazione di prodotti medicinali orfani all'Agenzia europea del farmaco (EMA)

L'Agenzia europea di valutazione dei medicinali (EMA) esamina sin dal 2000 attraverso il suo Comitato per i medicinali orfani (COMP), le domande di assegnazione della qualifica inoltrate da persone o da aziende (*sponsor*) che intendono sviluppare medicinali cosiddetti orfani, ossia destinati alla cura di pazienti affetti da malattie rare. L'Italia contribuisce a questa attività mediante la partecipazione del Dipartimento alle riunioni mensili del COMP.

La qualifica 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'apposita documentazione scientifica dell'uso previsto.

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, la legge concede incentivi agli *sponsor* e all'industria farmaceutica ai fini dello sviluppo di un medicinale orfano. I medicinali che hanno diritto agli incentivi indicati dovrebbero essere individuati mediante la procedura comunitaria di assegnazione della qualifica di medicinale orfano. Gli incentivi sono: esclusività di mercato per 10 anni; assistenza per l'elaborazione di protocolli; accesso alla procedura centralizzata; riduzione di quote di pagamento; ricerca finanziata 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 e efficacia necessari per la concessione dell'autorizzazione all'immissione in commercio.

Piano triennale

Il Dipartimento prevede di continuare per il prossimo triennio l'attività di designazione dei prodotti medicinali orfani, partecipando attivamente alle riunioni mensili del COMP all'EMA; inoltre, parteciperà alle riunioni di specifici *Working Groups* (es. *Working Group* su attività di sanità pubblica previsti in collaborazione con altri organismi internazionali quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità) che si andranno a costituire durante il prossimo triennio.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD): quality and proficiency testing for molecular genetic testing

Nel 2000 l'*Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) ha rilevato la necessità di effettuare un'analisi sulla *performance* dei laboratori che effettuano *test* genetici. Nello stesso anno, pertanto, 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 l'Istituto Superiore di Sanità, ha avuto un ruolo attivo in tutte le fasi di questo progetto.

Lo scopo dell'attività era:

raccogliere dati nei diversi Paesi sui controlli di qualità e sugli schemi di accreditamento in atto nei laboratori clinici che offrono *test* di genetica molecolare, per effettuarne un'analisi comparativa;

identificare aree di possibili cooperazioni internazionali per sviluppare *standard* e schemi di accreditamento;

facilitare la collaborazione internazionale fra gruppi che si occupano di specifiche patologie, in particolare per *test* genetici per patologie rare;

elaborare linee guida internazionali condivise fra i vari Paesi.

La collezione dei dati è stata effettuata mediante l'invio elettronico di questionari, attraverso i coordinatori nazionali, ai laboratori che eseguono *test* genetici.

I dati raccolti contenevano informazioni relative a:

- Organizzazione dei laboratori
- Qualifica del personale
- Tipi di *test* eseguiti
- Adozione di schemi di qualità
- Informazioni circa i campioni (in particolare lo scambio di campioni attraverso i vari Paesi)
- Tecniche impiegate
- Pratiche di refertazione (inclusa la consulenza)
- Schemi di accreditamento
- Uso del consenso informato.

I coordinatori dei 18 Paesi hanno individuato una lista di laboratori pubblici e privati ai quali inviare il questionario. In totale sono state raccolte informazioni provenienti da circa 600 diversi laboratori; ciascun laboratorio ha partecipato in maniera anonima e tutti i dati sono stati raccolti in una banca dati per l'analisi.

Per quanto riguarda l'Italia, la selezione dei laboratori è stata effettuata dall'ISS attraverso l'elenco dei laboratori partecipanti al "Progetto Nazionale per la Standardizzazione e l'Assicurazione di Qualità dei *Test* Genetici" (D.L.502/92 art.12, comma 2, lett. A), il censimento annuale della Società Italiana di Genetica Umana, l'elenco dei laboratori della Società di Biochimica Clinica e altri.

Sulla base dei primi 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.

Al termine della fase di elaborazione dei risultati, è iniziata la stesura di linee guida per la buona pratica nei laboratori di genetica molecolare.

Piano triennale

Si intende completare lo studio intrapreso a livello internazionale, in particolare sono previste le seguenti attività:

Definizione di specifici *standard* di qualità come misura principale per l'assicurazione di qualità.

Internazionalizzazione dei *test* genetici e creazione di *network* di *test* genetici (per specifiche malattie).

Predisposizione di un *trasborder flow* efficiente, sicuro e efficace dei campioni biologici per malattie rare al di là delle esistenti barriere burocratiche e economiche.

Elaborazione di linee guida per la buona pratica nei laboratori di genetica molecolare, da diffondere e far adottare in tutti i laboratori dei Paesi OECD.

Lo scopo finale dell'attività prevista è garantire per i *test* genetici, nell'ambito dei paesi OECD, personale qualificato e *standard* di riferimento adeguati, elementi fondamentali per assicurare la qualità dei servizi che effettuano *test* genetici molecolari.

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 *rappporteur*, 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 il Ministero della Salute, 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 (e eventualmente internazionale nella ICH) dei criteri di autorizzazione, in vista del recepimento della direttiva europea 2001/CE sulla sperimentazione clinica.

Piano triennale

Attività nazionali

Valutazione dei *dossier* di richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica.

Attività ispettiva alle aziende che producono medicinali sperimentali per terapia genica e cellulare, in collaborazione con l'AIFA.

Formazione dei ricercatori clinici e dei direttori tecnici impegnati sia nella sperimentazione sia nella produzione dei medicinali per terapia genica e cellulare, mediante *workshop* e corsi specifici in questo ambito.

Attività internazionali

Valutazione delle richieste di *scientific advice* presentate all'EMA da parte di *sponsor* di sperimentazioni cliniche con prodotti medicinali per terapia genica.

Partecipazione presso l'EMA ai lavori del *Gene Therapy Working Party*, che discute gli aspetti emergenti nella valutazione dei prodotti medicinali per terapia genica in vista di una armonizzazione europea, ed eventualmente internazionale nella ICH, dei requisiti per l'autorizzazione dei prodotti medicinali per terapia genica.

Partecipazione presso l'EQM/*European Pharmacopoeia* ai lavori del *Gene Therapy Working Group*, che discute la qualità dei prodotti medicinali per terapia genica in vista di una armonizzazione europea dei requisiti per la produzione dei medicinali per terapia genica.

Collaborazione con EMA ed EQM per ispezioni internazionali ad aziende che producono medicinali sperimentali per terapia genica.

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, OMS, IBRO, NIH, ecc.) e verifica di rispetto delle buone prassi scientifiche in massima parte coincidono. Collegata all'attività di valutazione delle richieste di autorizzazione in deroga i ricercatori del Reparto di Neuroscienze comportamentali svolgono attività di formazione su questi temi indirizzata alla comunità biomedica nazionale.

Piano triennale

Contribuire all'identificazione di parametri comportamentali e fisiologici per una visione integrata e multidisciplinare del livello di benessere;

Incrementare lo scambio di informazioni e spunti sia teorici che metodologici tra tre contesti principali (animali da laboratorio, animali da allevamento, animali da compagnia), attingendo all'esperienza etologica.

Avviare una analisi, basata su dati scientifici e considerazioni bioetiche, sui possibili sviluppi della *pet therapy*, compresi gli aspetti che riguardano la formazione di personale specializzato.

Valutare la possibilità di coniugare aspetti etici con esigenze più legate alle esigenze e alle procedure stringenti della sperimentazione. Nel caso degli animali da laboratorio, la stabulazione in un ambiente arricchito, che potrebbe rispondere ad un'esigenza di tipo etico, ha un suo risvolto scientifico perché sempre più in letteratura, in particolare nel campo delle Neuroscienze, vengono pubblicati dati che dimostrano che animali mantenuti in ambienti fisicamente e socialmente più complessi forniscono dati scientificamente più validi, anche perché meno variabili.

**Dipartimento
Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare**

Attività di ricerca

Analisi dell'espressione genica e studio del ruolo dei geni HOX e dei microRNA nei processi di proliferazione e differenziamento in cellule umane

Il progetto prevede di studiare l'espressione dei geni HOX, che codificano per fattori di trascrizione implicati nella morfogenesi, e dei microRNA (miR), che sono piccoli RNA non codificanti che fungono da repressori della traduzione di mRNA bersaglio, durante il processo di differenziamento in cellule umane di diversa natura. In primo luogo verrà approfondita la relazione strutturale che intrcorre tra il gene HOXD4 e il miR-10b, che vengono espressi come un trascritto primario comune che successivamente viene processato, durante il differenziamento di cellule neurali. Si studierà inoltre l'effetto del fattore di trascrizione HOXD4 e del miR-10b su i rispettivi geni bersaglio e l'eventuale ruolo cooperativo della loro regolazione. Questo sarà realizzato analizzando per *microarray* i profili di espressione genica risultanti dalla overespressione e dalla soppressione (mediante siRNA) dell'HOXD4, comparandoli con i bersagli predetti per il miR-10b e verificando poi con varie tecniche l'efficacia di tali interazioni regolative nei sistemi cellulari usati. Verrà infine effettuata un'analisi dei profili di espressione genica durante il processo di differenziamento ematopoietico e neurale, utilizzando l'analisi per *microarray* su varie fasi di cinetiche di differenziamento lungo diverse vie maturative.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio dell'espressione del gene HOXD4 e del miR-10b e del loro trascritto primario comune permetterà di comprendere i meccanismi della loro espressione coordinata. L'identificazione dei loro rispettivi geni bersaglio (su cui agiscono con meccanismi regolativi diversi, trascrizionale o traduzionale) consentirà di comprendere anche come le loro funzioni regolative siano interconnesse. L'analisi per *microarray* delle cinetiche di differenziamento cellulare forniranno il quadro dei profili di espressione genica delle diverse fasi del differenziamento in tipi cellulari diversi. Questo consentirà di comprendere quali siano i geni e di conseguenza i meccanismi cellulari implicati in questi processi.

Trasferibilità dei risultati

I geni HOX sono regolatori della trascrizione implicati in processi biologici fondamentali, come morfogenesi, proliferazione e differenziamento cellulare. I microRNA sono regolatori della traduzione di geni bersaglio che sembra abbiano un ruolo importante nel determinare e/o controllare l'indirizzo differenziativo nelle cellule. La loro disregolazione può essere legata a malformazioni, patologie e cancro. La conoscenza dei loro meccanismi di azione è importante per la comprensione dei processi biologici fondamentali che controllano questi fenomeni.

Basi molecolari delle malattie mieloproliferative

Le malattie mieloproliferative (MPD) sono alterazioni preneoplastiche del compartimento staminale ematopoietico che determinano la produzione incontrollata di cellule mieloidi mature. Con l'eccezione della leucemia mieloide cronica, per la quale l'identificazione del gene di fusione BCR-ABL come alterazione molecolare patogenetica ha permesso lo sviluppo di una terapia mirata, non esistono terapie specifiche per le MPD e la maggioranza dei pazienti va incontro a complicazioni fatali. Recentemente è stata individuata nei pazienti con malattie mieloproliferative una mutazione attivante del gene JAK2 (V617F) che si presenta con alta frequenza nei casi di Policitemia Vera e in misura minore nei pazienti con Trombocitemia Essenziale e sembra coinvolta nella produzione incontrollata di cellule mieloidi attraverso meccanismi non ancora chiariti. I nostri studi mirano a definire il ruolo funzionale della mutazione di JAK2 nello sviluppo delle MPD attraverso l'analisi degli eventi innescati da JAK2 in cellule progenitrici ematopoietiche e la produzione di strumenti molecolari in grado di

attivare o inibire i singoli effettori a valle. La comprensione dei meccanismi con cui le mutazioni genetiche associate alle MPD provocano l'espansione clonale delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche potrebbe aprire la strada a nuove soluzioni terapeutiche in grado di inibire la mieloproliferazione e la possibile progressione neoplastica.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di modelli *in vitro* e *in vivo* di ematopoiesi patologica basata sull'introduzione del gene mutato JAK2 V617F in cellule staminali/progenitrici ematopoietiche umane. Identificazione degli eventi molecolari attivati da JAK2 V617F in cellule progenitrici ematopoietiche e responsabili dell'alterata espansione del compartimento mieloide caratteristico delle MPD. Analisi dei profili di espressione genica e attivazione proteica in cellule progenitrici mieloidi provenienti da individui sani e affetti da Policitemia Vera o Trombocitemia Essenziale attraverso tecniche di *microarray* e fosfoproteomica.

Caratterizzazione dei meccanismi molecolari che regolano la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali embrionali e tumorali

Lo scopo principale di questo progetto è lo studio dei meccanismi molecolari che regolano la proliferazione cellulare e il differenziamento nelle cellule staminali embrionali e tumorali. In particolare ci proponiamo i seguenti obiettivi: i) analisi dettagliata del ciclo cellulare e dei complessi proteici Rb-E2F che giocano un ruolo importante nel controllare l'equilibrio tra *self-renewal* e differenziamento nelle cellule staminali; ii) studio della via di trasduzione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K) e dei complessi Cdk-ciclina A/E durante il *self-renewal* delle cellule staminali; iii) caratterizzazione dei complessi proteici della cellula staminale tumorale mediante tecnologie di analisi proteomica; iv) studio dell'espressione specifica di microRNA nelle cellule staminali embrionali e durante il loro successivo differenziamento. L'analisi molecolare dei *pathway* Rb-E2F e PI3-K potrebbe essere di primaria importanza nella comprensione dei meccanismi molecolari responsabili del *self-renewal* e delle proprietà tumorali delle cellule staminali embrionali. Infine, questi studi possono essere di notevole utilità nel creare nuove strategie per il controllo della proliferazione cellulare durante la formazione dei tumori.

Risultati attesi nel triennio

Primo anno. Particolare attenzione verrà data alla caratterizzazione biochimica del *pathway* della PI3-K e dei complessi Cdk2-ciclina E.

È possibile ipotizzare che distinti complessi enzimatici, siano specificatamente espressi nell'illimitata proliferazione delle cellule staminali embrionali e tumorali.

Nel triennio. Analizzeremo il ruolo dei *pathway* Rb-E2F e PI3-K e dei complessi Cdk2-ciclina E in cellule staminali che sono mutate nel gene ERas o che esprimono il gene dominante negativo p85 mediante un sistema tetraciclina inducibile. La nostra aspettativa è che le variazioni dinamiche tra Rb e l'attività dei complessi Cdk2 possono avere un ruolo molto importante nel controllo della illimitata capacità di *self-renewal* e del potenziale di differenziazione cellulare delle cellule staminali embrionali.

Trasferibilità dei risultati

L'analisi molecolare dei *pathway* E2F-Rb e PI3-K potrebbe essere di primaria importanza nella comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della formazione del tumore nelle cellule staminali leucemiche.

Caratterizzazione funzionale di una sottopopolazione monocitaria con caratteristiche endoteliali nell'ematopoiesi normale e leucemica

Studi recenti hanno indicato che cellule monocitarie esprimono marcatori endoteliali e siano capaci in appropriate condizioni di coltura di differenziare *in vitro* in cellule endoteliali. Lo scopo della nostra ricerca consisterà nel valutare le caratteristiche biologiche di queste cellule in varie condizioni fisiopatologiche. In particolare, studi nei soggetti normali saranno rivolti a determinare la capacità di queste cellule di differenziare in senso endoteliale e la funzionalità delle cellule endoteliali così generate. In parallelo verranno effettuati studi nei soggetti affetti da malattie cardiovascolari e rivolti a valutare il possibile ruolo svolto da queste cellule nei meccanismi di riparazione dei danni derivati da malattia aterosclerotica. Infine, gli studi realizzati nelle leucemie acute mieloidi avranno come obiettivo di determinare un possibile coinvolgimento di queste cellule nelle leucemie acute mieloidi, e in particolare nelle leucemie a fenotipo monocitario.

Risultati attesi nel triennio

Viene atteso durante questi tre anni di attività di potere determinare il ruolo funzionale di queste cellule nei processi riparativi endoteliali. Viene altresì atteso di potere determinare il ruolo svolto da queste cellule nei processi riparativi ai danni risultanti dalle complicazioni ischemiche della malattia arteriosclerotica. Infine, viene atteso di potere stabilire un possibile coinvolgimento di queste cellule in alcune leucemie acute.

Trasferibilità dei risultati

Le ricerche da noi condotte potrebbero avere delle interessanti implicazioni per lo sviluppo di terapie basate sull'utilizzo di cellule monocitarie.

Cellule staminali normali e neoplastiche: studi di base e importanza clinica potenziale

Gli studi finora effettuati hanno dimostrato che il KDR è un marcatore chiave per le CSE postnatali CD34, ma è ancora necessario stabilire in modo conclusivo la capacità di attecchimento a lungotermine delle cellule CD34+KDR+. Poiché questa popolazione cellulare è poco rappresentata, il nostro obiettivo è quello di amplificarla conservandone le potenzialità. Inoltre l'espansione di CSE è un importantissimo strumento per i trapianti di cellule staminali nei protocolli clinici oncologici (uso delle CSE di sangue cordonale in pazienti con leucemia, privi di un donatore compatibile per HLA). Per questo motivo abbiamo messo a punto un sistema di coltura *ex vivo* in assenza di stroma e in presenza di citochine quali il ligando flt3/flk2 (FL), la trombopoietina (TPO), il fattore delle cellule staminali (SCF) e l'interleukina6 (IL-6), in grado di mantenere e espandere queste cellule. Cellule di CB CD34+ espanse per un periodo di 4 settimane a confronto, hanno messo in evidenza il mantenimento dell'espressione di marcatori specifici per le cellule staminali immature CD34, Oct4) e l'aumento dopo espansione di altri marcatori di staminalità (ABCG2). Questo può far pensare che la combinazione di citochine utilizzato nel nostro laboratorio sia in grado di espandere e mantenere la cellula in uno stato molto immaturo e potenzialmente multipotente, portando nel contempo a un'amplificazione del numero delle CD34+ di origine emopoietica, ma con potenzialità verso altre linee cellulari.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste premesse, intendiamo definire i limiti e le potenzialità delle HSCs di cordone ombelicale. Valuteremo la capacità di differenziamento in senso neuronale, muscolare e epatocitario, partendo da sottopopolazioni di cellule CD34+ sia "non manipolate, che dopo espansione *ex-vivo*". Al fine di meglio studiare queste potenzialità nelle cellule di cordone

ombelicale umano, verranno allestite delle espansioni *ex vivo* di differenti sottopopolazioni con caratteristiche immunofenotipiche di staminalità e/o di linea note e tali precursori verranno analizzati in base all'espressione di marcatori molecolari tipici della linea neuronale come anche di staminalità (CD34, ABCG2, OCT4). Per studiare la capacità di differenziare in muscolo, le sottopopolazioni saranno trasdotte con vettore lentivirale pCCL.PGK.GF e poi espanse in varie condizioni di coltura. Verrà poi, studiata la generazione di miotubi *in vitro*. Infine si procederà all'analisi dell'espressione genica muscolo-specifica. Per poter osservare una differenziazione epatica le varie frazioni cellulari saranno espanse in diverse condizioni di coltura per 4 settimane. A vari tempi sarà effettuata un'analisi molecolare e di immunofenotipo di marcatori epatici. Una piccola frazione di tali cellule, sarà inoculata *in vivo* in topi NOD/SCID/gamma c null irradiati subletalmente, a cui sarà indotto un danno epatico farmacologico al fine di favorire un fenomeno di rigenerazione epatica da parte delle cellule cordonali.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione, l'isolamento, la caratterizzazione e l'espansione delle cellule KDR+ avrà delle ricadute importantissime in tutte le patologie degenerative, quali: l'infarto del miocardio, il morbo di Alzheimer, patologie epatiche, i vari tipi di diabete, nonché nei trapianti in patologie mieloproliferative.

Deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi: diagnosi molecolare e studi epidemiologici

Il deficit di G6PD è una malattia genetica con ereditarietà legata al sesso, classificata come malattia rara e caratterizzata da una marcata eterogeneità molecolare, degli aspetti clinici e di laboratorio. Le manifestazioni cliniche del deficit sono: iperbilirubinemia neonatale, emolisi acuta e, raramente, anemia emolitica cronica. La gravità delle manifestazioni cliniche, maggiore nei neonati e nei primi anni di vita, è correlata alla variabilità del difetto molecolare e alla concomitante presenza di fattori scatenanti l'emolisi (*stress* ossidativi). Il gene (Gd) che codifica l'enzima G6PD 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 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.

La ricerca si prefigge tre obiettivi principali: i) applicazione dei più recenti metodi di analisi molecolare per l'individuazione delle mutazioni note o ancora sconosciute alla base del deficit; ii) definizione di un protocollo per la diagnosi molecolare del deficit; iii) studio epidemiologico delle mutazioni presenti in Italia, anche in considerazione dei recenti flussi migratori da paesi in cui il deficit di G6PD è prevalente.

Risultati attesi nel triennio

Ottimizzazione e valutazione di un metodo di amplificazione allele specifica a tubo unico (Multiplex ARMS) per l'identificazione delle mutazioni più frequenti in Italia, da proporre come metodo di *screening*, attuabile anche in laboratori non specialistici.

Sviluppo di un metodo di cromatografia liquida denaturante ad alta risoluzione (DHPLC) per l'esame della regione codificante e non codificante del gene Gd.

Applicazione del metodo in DHPLC per lo *screening* di mutazioni note.

Studio epidemiologico delle mutazioni del gene Gd in campioni di carenti e portatori del difetto residenti in Italia.

Sviluppo di *microarray* a DNA per la diagnosi di tutte le mutazioni evidenziate con lo studio epidemiologico.

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.

Diagnostica delle anemie emolitiche ereditarie associate a difetti enzimatici e di membrana dei globuli rossi

Il progetto riguarda la diagnostica del difetto di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), della sferocitosi (HS) e dell'ellissocitosi (HE) ereditarie che sono i più comuni difetti genetici dei globuli rossi, rispettivamente a livello dei sistemi enzimatici e della membrana. La manifestazione clinica comune di tali difetti è l'anemia emolitica acuta o cronica di gravità variabile, dalle forme lievi ben compensate a quelle trasfusione-dipendenti. Sono previsti i) studi su nuovi parametri e metodi diagnostici, ii) elaborazione di protocolli diagnostici standardizzati e cartelle cliniche specialistiche, iii) valutazione epidemiologica.

Alle ricerche sono collegate i) attività di consulenza e collaborazione con presidi diagnostici e centri di riferimento ospedalieri afferenti alla rete nazionale delle malattie rare (DM 18-5-01 n. 279); ii) attività di laboratorio di riferimento nell'ambito del *European Network for Rare Congenital Anaemias*.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di metodi innovativi per l'identificazione di mutazioni specifiche del gene della G6PD: cromatografia liquida denaturante ad alta risoluzione, *microarrays*.

Definizione di profili biochimici caratteristici di HS e HE con elevata diffusione nella popolazione italiana

Valutazione della frequenza di mutazioni specifiche del gene della G6PD nella popolazione della regione Lazio.

Definizione di protocolli diagnostici standardizzati per il *deficit* di G6PD e i difetti genetici della membrana eritrocitaria associati ad HS e HE.

Elaborazione di cartelle cliniche specialistiche per il *deficit* di G6PD e i difetti genetici della membrana eritrocitaria associati ad HS e HE.

Trasferibilità dei risultati

I nuovi metodi e i protocolli diagnostici trovano applicazione nei presidi ospedalieri e nei centri di riferimento afferenti alla rete nazionale delle malattie rare.

Le cartelle cliniche specialistiche possono essere utilizzate presso i centri ematologici ospedalieri e rappresentano la base per l'istituzione dei registri nazionali (DM 18-05-01, n. 279).

Le valutazioni epidemiologiche trovano applicazione nell'elaborazione di programmi di medicina preventiva.

Fisiopatologia dei difetti della membrana eritrocitaria

La sferocitosi e l'ellissocitosi ereditarie sono anemie emolitiche determinate da un difetto congenito delle proteine della membrana eritrocitaria. Anomalie nelle proteine della membrana eritrocitaria possono determinare la distruzione delle interazioni tra le componenti del membrano-scheletro, la perdita dell'integrità strutturale e funzionale della membrana e causare, infine, l'emolisi. Due tipi di interazioni risultano particolarmente importanti per la stabilità della membrana, quelle verticali, tra il citoscheletro e il doppio strato lipidico, che coinvolgono la

proteina banda 3, l'anchirina, la spettina e la proteina 4.2 e quelle orizzontali, tra le diverse componenti del citoscheletro che formano il *network* di sostegno, che coinvolgono spettina (alfa e beta), proteina 4.1R e actina. Difetti delle interazioni orizzontali portano alla ellissocitosi ereditaria, difetti nelle interazioni verticali risultano nella sferocitosi ereditaria, pertanto difetti di diverse proteine possono indurre lo stesso fenotipo. La ricerca si propone lo studio e la caratterizzazione delle anomalie strutturali e funzionali della membrana eritrocitaria nella sferocitosi e ellissocitosi ereditarie associata a quadri clinici di varia gravità, anche in presenza di altri difetti congeniti come la beta talassemia.

Inoltre studi recenti suggeriscono che le componenti proteiche del membrano-scheletro del globulo rosso siano presenti anche in cellule non eritroidi (cuore, muscolo scheletrico, cervello, rene) e pertanto lo sviluppo delle conoscenze sui meccanismi che sono alla base dei difetti della membrana eritrocitaria potrà fornire informazioni sul ruolo di tali componenti in cellule nucleate non eritroidi. Come nel caso della proteina 4.1R che è presente e espressa nelle cellule nervose. Il progetto si propone pertanto lo studio e la caratterizzazione del difetto di proteina 4.1R osservato in casi di acantocitosi associata a malattia neurodegenerativa (neuroacantocitosi).

Risultati attesi nel triennio

La ricerca avrà particolare importanza nello studio delle anemie emolitiche ereditarie, in particolare nella sferocitosi ed ellissocitosi ereditarie poiché svilupperà le conoscenze sui meccanismi che sono alla base della malattia, permetterà di indagare sulle cause della presenza di una sintomatologia più severa nel periodo neonatale e fornirà un inquadramento delle manifestazioni cliniche secondarie al difetto di membrana vale a dire splenomegalia, colelitiasi e trombosi. Inoltre lo studio dei difetti di membrana nelle associazioni tra sferocitosi e ellissocitosi ereditarie e beta talassemia permetterà di indagare sulle basi molecolari delle alterazioni strutturali del globulo rosso che determinano un quadro morfologico del sangue periferico confrontabile con quello della talassemia intermedia.

Per quanto riguarda lo studio e la caratterizzazione del difetto di proteina 4.1R osservato in casi di neuroacantocitosi, la ricerca fornirà nuove conoscenze sul ruolo della proteina 4.1R nel regolare la stabilizzazione dei recettori AMPA sulla superficie dei neuroni e su come le alterazioni di questa proteina possano contribuire all'espressione delle anomalie motorie presenti in questa malattia neurodegenerativa.

Diagnosticarle può non essere semplice poiché il quadro clinico è molto eterogeneo, dal portatore asintomatico all'emolisi cronica grave trasfusione-dipendente. Inoltre lo studio delle interazioni delle componenti della membrana dell'eritrocita potrà fornire informazioni sul ruolo di tali componenti in cellule nucleate non eritroidi.

Trasferibilità dei risultati

La ricerca potrà fornire risultati utili per i Centri accreditati che si occupano di prevenzione, sorveglianza, diagnosi e terapia di queste malattie rare e potrà fornire spunti per studi di nuove terapie farmacologiche.

Funzione dei micro-RNA nel sistema cardiovascolare: ricerche di base e modelli terapeutici

Evidenze crescenti indicano che i microRNA (miR) sono implicati nelle funzioni cellulari di base e nell'oncogenesi. Nulla si sa invece sul ruolo dei miR nelle cardiopatie. Abbiamo determinato che il miR-133 è cardiaco-specifico ed è critico nella determinazione dell'ipertrofia dei cardiomiociti (CMC). Difatti, l'espressione endogena di miR-133 è diminuita drammaticamente nell'ipertrofia cardiaca sia nei modelli in vitro che nei modelli in vivo (origina quella del miR-1, che forma un complesso bicistronico con il miR-133). L'espressione di miR-133 abolisce i parametri dell'ipertrofia (tra cui l'aumento della misura di CMC, la sintesi

proteica, la riorganizzazione strutturale del citoscheletro e la ri-espressione dei geni fetali). Per contro, la soppressione del miR-133 da parte di sequenze “decoy” induce un'ipertrofia drammatica delle CMC, che è ancor più pronunciata che dopo il trattamento con agonisti farmacologici inducenti ipertrofia. L'espressione miocardica in vivo del miR-133 riduce la grandezza dei cardiomiociti in modelli di ipertrofia miocardica, mentre l'espressione miocardica in vivo del “decoy” di miR-133 induce un incremento significativo della grandezza dei CMC. Abbiamo identificato che i bersagli del miR-133 includono il fattore nucleare NELF-A, coinvolto nella genesi del cuore, e la chinasi del segnale di trasduzione CDC42, implicata nell'ipertrofia cardiaca. Di conseguenza, la “overespressione” o la “downmodulazione” di miR-133 causa una fluttuazione inversa di NELF-A e di CDC42 al livello della proteina, mentre l'espressione del mRNA resta invariata. Complessivamente, i nostri dati indicano che miR-133 è un gene “maestro” (“*mastergene*”) che controlla l'ipertrofia cardiaca.

Risultati attesi nel triennio

Studio della modulazione dell'ipertrofia cardiaca attraverso l'uso di modulatori di livelli endocellulari del microRNA-133 e quindi dei suoi bersagli molecolari.

HOXB1 e HOXB7: geni chiave della trasformazione neoplastica.

Profili di espressione e regolazione genica in cellule normali e tumorali

Nell'ultimo decennio è emerso chiaramente il ruolo funzionale della famiglia dei geni omeotici nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare e, di conseguenza, la stretta correlazione tra espressione aberrante dei geni HOX e trasformazione neoplastica. Dopo una serie di studi sulla funzione oncogena di HOXB7 nel melanoma, ci siamo focalizzati sulla ricerca di fattori regolatori a monte di HOXB7 in grado di reprimerlo. In particolare l'identificazione di una forma di regolazione post-traduzionale, basata sulla funzione di una nuova classe di piccoli RNA regolatori, i microRNA, (21-25 nucleotidi), capaci di legare sequenze omologhe localizzate al 3' dei geni codificanti, ci ha offerto un interessante campo d'indagine. Nell'ambito di questo studio abbiamo già individuato alcuni microRNA potenzialmente coinvolti nell'insorgenza e nella progressione tumorale. Inoltre sono in corso studi su microRNA ritenuti rilevanti nella proliferazione e nel differenziamento di cellule staminali/ progenitori ematopoietici.

Parallelamente studi di espressione genica, effettuati su più di 30 linee cellulari neoplastiche di diversa origine, hanno dimostrato che il 90% di tali tumori non esprime HOXB1; al contrario HOXB1 è trascritto nelle controparti cellulari normali. Questi risultati suggeriscono che HOXB1 svolga un ruolo di “*tumor suppressor gene*”, fondamentale nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, e che tale funzione venga quindi a mancare nelle cellule tumorali. Studi di trasduzione genica in cellule normali e neoplastiche serviranno a chiarire la validità di questa ipotesi.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base dei dati ottenuti mediante *microarray* e mediante l'uso di algoritmi specifici, approfondiremo lo studio di una serie di miR teoricamente in grado di modulare HOXB7, direttamente o indirettamente attraverso la regolazione di fattori trascrizionali a monte di HOXB7 stesso. Studi funzionali di over-espressione o di abrogazione dei miR nonché saggi di luciferasi permetteranno di valutare il reale ruolo di queste microsequenze nel nostro sistema cellulare e auspicabilmente di individuare le anomalie responsabili dell'attivazione costitutiva di HOXB7 nelle cellule tumorali. Sulla base dei dati di espressione valutati mediante *microchip*, abbiamo selezionato anche alcuni microRNA con una forte regolazione durante la maturazione dei diversi *lineages* ematopoietici; ulteriori studi serviranno a valutare la possibilità di regolare

la crescita e il differenziamento attraverso la trasduzione di miR specifici e la conseguente modulazione dei geni bersaglio.

Scopo della seconda parte del progetto è valutare gli effetti funzionali derivanti dalla riespressione di HOXB1 in linee cellulari leucemiche e di melanoma. Interessanti dati preliminari mostrano infatti che la presenza di HOXB1 favorisce il differenziamento e induce apoptosi. Saggi funzionali in vitro e in vivo serviranno a confermare il ruolo di gene oncosoppressore di HOXB1.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di un repressore di un *master gene* della tumorigenesi, quale è HOXB7, potrebbe rappresentare un potente bersaglio terapeutico. Infatti attraverso la sua abrogazione potremmo essere in grado di inibire i numerosi geni attivati da HOXB7, già noti per il loro coinvolgimento nella proliferazione e nella neoangiogenesi tumorale, quali bFGF, VEGF, angiopoietina-2, IL-8. I microRNA sono degli ottimi candidati a svolgere questo ruolo biologico.

Risultati importanti si potrebbero ottenere anche con il ripristino del ruolo oncosoppressivo di HOXB1 in cellule leucemiche e di melanoma.

Identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti nelle decisioni della cellula staminale emopoietica (proliferazione/apoptosi/differenziazione)

L'attività di ricerca userà un modello murino in cui le decisioni tra proliferazione/differenziazione/apoptosi sono state alterate modulando la capacità delle cellule di trascrivere un fattore di trascrizione GATA-1 (la mutazione ipomorfica Gata1low). Questi mutanti presentano un fenotipo adulto complesso che comprende non solo anomalie nel *pathway* di differenziazione eritroide ma anche aumentata apoptosi nel compartimento dei mastociti connettivali (Migliaccio AR, et al. J Exp. Me. 197:281-296, 2003) e insorgenza di un quadro patologico simile alla mielofibrosi umana (Vannucchi A et al, Blood, 100: 1123, 2002), una sindrome mieloproliferativa di origine clonale la cui eziologia è ancora sconosciuta (Tefferi A. New Engl J Me 342: 1255, 2000). Si propongono per i prossimi tre anni due obiettivi specifici:

1) Chiarire il ruolo di GATA-1 nel controllo della decisione tra proliferazione e differenziazione nei progenitori eritroidi. L'ipotesi di lavoro è che le concentrazioni relative GATA-1/GATA-2 fungono da *switch* tra proliferazione/differenziazione a livello di queste cellule.

2) Caratterizzare, a livello istologico, cellulare, e molecolare, il difetto mastocitario nei mutanti GATA-1low.

Una volta che i meccanismi saranno stati chiariti nel modello murino, si controllerà quanto questi meccanismi sono validi nell'uomo e se ci sono variazioni con l'ontogenesi facendo esperimenti mirati in vitro con cellule purificate umane adulte e neonatali (sangue di cordone).

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo 1): Si valuterà l'effetto di *over*-espressione (infezione con vettori retrovirali specifici), e inibizione di espressione (trattamenti con oligonucleotidi antisense) dei geni GATA-1 e GATA-2 sulla proliferazione/differenziazione *in vivo* (trapianto di midollo) e *in vitro* (analisi clonali) di cellule staminali purificate dai topi normali e mutanti.

Obiettivo 2): Ci proponiamo di verificare se i topi GATA-1low possano rappresentare un modello animale per lo studio delle alterazioni delle risposte allergiche nell'uomo. A questo proposito, gli animali saranno trattati con stimolatori della risposta mastocitaria (SCF e IL-3) e la loro risposta paragonata a quella dei controlli normali.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, associazioni di pazienti e sistema sanitario nazionale

Identificazione e analisi del differenziamento di cellule staminali multitissutali

I nostri progetti sono volti alla caratterizzazione dei meccanismi cellulari e molecolari di differenziamento di cellule staminali totipotenti. I modelli cellulari disponibili e in uso nel dipartimento comprendono: cellule staminali neurali (neurosfe) umane, embrionali e adulte; mesoangioblasti murini, ottenuti dal Prof. Cossu, dell'Università La Sapienza di Roma; cellule staminali ematopoietiche, purificate da sangue periferico e di cordone ombelicale. Il differenziamento cellulare in diversi tessuti mesenchimali (osso, tessuto adiposo, endotelio, muscolo liscio, scheletrico e miocardio) viene indotto in vitro mediante *medium* differenziativi specifici, o mediante cocoltura con cellule differenzianti del tessuto di destinazione. Inoltre, sono in uso nel nostro gruppo metodi per l'analisi del differenziamento *in vivo*, quali trapianto di midollo osseo, e modelli di rigenerazione di muscolo scheletrico. I progetti attualmente in corso riguardano in particolare:

- caratterizzazione e purificazione di sottopopolazioni di neurosfere ad alta staminalità, sulla base dell'espressione di *marker* di membrana;

- studio della regolazione del differenziamento di cellule staminali neurali da parte di fattori di crescita e segnali mediati dalla membrana;

- analisi del potenziale differenziativo di mesangioblasti isolati da topi distrofici, in relazione all'età dell'animale, per verificarne la capacità terapeutica, in seguito a ripristino del gene mutato mediante vettori lentivirali.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi sul potenziale differenziativo di cellule staminali multitissutali hanno come scopo ultimo l'identificazione di protocolli per la terapia cellulare, potenzialmente utilizzabili per un vasto numero di malattie degenerative.

In particolare, sono già presenti in letteratura studi sull'impiego di neurosfere in modelli animali di rigenerazione spinale, Parkinson, ecc. La possibilità di ottenere sottopopolazioni di neurosfere purificate ad alta staminalità può consentire l'ottimizzazione e la standardizzazione di tali approcci terapeutici.

I mesangioblasti sono presentemente al centro di numerosi studi. *Trial* preliminari sul trapianto autologo con mesangioblasti modificati mediante terapia genica, indicano una capacità terapeutica sensibile nella terapia delle distrofie muscolari, su animali in fase neonatale. Dal momento che una grossa quota di pazienti umani ha superato la fase infantile precoce, lo studio del potenziale differenziativo di cellule isolate da animali di età differenti, è un indispensabile preliminare al trasferimento del sistema terapeutico nell'uomo.

Individuazione dei criteri di mantenimento del paziente emodializzato in attesa di trapianto

Preservare al meglio lo stato di salute del paziente uremico in attesa di trapianto rappresenta l'obiettivo del progetto. La necessità di controllare la qualità e l'adeguatezza del trattamento emodialitico mediante un sistema di monitoraggio in grado di prevenire, almeno in parte, l'instaurarsi di patologie correlate e il decadimento delle principali funzioni fisiologiche è un'esigenza fondamentale per questo tipo di pazienti. Il malfunzionamento del sistema immunitario e cardio-circolatorio rappresentano alcune tra le alterazioni correlate all'accumulo e/o all'indiscriminata sottrazione di sostanze dal sangue. Particolare interesse verrà posto nella ricerca di indicatori biochimici precoci, sensibili e specifici che siano in grado di migliorare le attività di prevenzione, diagnosi e prognosi della malattia. Verranno studiati gruppi di pazienti suddivisi per età anagrafica, anzianità di trattamento e strategie dialitiche a protocollo definito. Lo studio valuterà in particolare quei processi biochimici che sono alla base dello "stress ossidativo" e il comportamento di quegli elementi che sono alla base di patologie da accumulo o

che, a causa della loro maggiore o minore presenza legata al trattamento, determinano squilibri metabolici. Verrà valutata inoltre, in un modello animale, l'azione degli AGEs tossici (molecole generate dalla glicosilazione non enzimatica di proteine, peptidi e acidi nucleici) sulla funzionalità renale utilizzando due strategie sperimentali: 1) studio di regimi dietetici a basso contenuto di AGEs di origine alimentare, 2) studi *in vitro* e *in vivo* dell'azione di farmaci inibitori o *cross-link breakers* degli AGEs.

Risultati attesi nel triennio

La determinazione dei livelli di *stress* ossidativo permetterà di individuare condizioni e/o trattamenti in grado di prevenire o ridurre il rischio di insorgenza di alcune patologie correlate all'accumulo di sostanze (pro)ossidanti. L'individuazione di indicatori biochimici di danno precoci, sensibili e specifici sarà in grado, inoltre, di migliorare le attività di prevenzione, diagnosi e prognosi della malattia e di rallentare il decadimento delle principali funzioni fisiologiche attraverso l'attuazione di opportune strategie dialitiche, terapie farmacologiche e regimi alimentari. Si individueranno inoltre, per le singole strategie di dialisi, i parametri biochimici di efficienza maggiormente predittivi. Si cercherà di individuare la migliore strategia, nutrizionale o farmacologia, per ridurre l'accumulo di AGEs tossici nel tessuto renale. Verrà inoltre svolta un'attività di coordinamento con i centri dialisi per la diffusione di informazioni riguardanti linee guida, creazione di registri dati rilevanti, raccolta e aggiornamento sistematico di informazioni. Tutto quanto esposto potrà permettere una maggiore efficienza e semplificazione delle procedure operative.

Trasferibilità dei risultati

Si ritiene che alcuni risultati troveranno immediato impiego nella pratica clinica consentendo di ritardare l'ingresso in dialisi, migliorare l'efficienza dialitica e ridurre l'incidenza delle patologie correlate, con conseguente riduzione della spesa sociale sanitaria per questo tipo di patologia.

Isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali CD34^{low}KDR⁺

L'obiettivo del progetto consiste nell'isolamento e caratterizzazione delle cellule KDR⁺ per utilizzo delle stesse nella terapia di numerose patologie umane.

Il KDR viene espresso anche da una minuscola frazione delle cellule CD14 del sangue periferico adulto. Queste cellule hanno la capacità di generare endotelio funzionalmente attivo. Un recente lavoro ha indicato che i progenitori endoteliali possono derivare sia da cellule CD34 che da cellule CD14, venendo definiti dalla espressione di KDR. Le cellule KDR sono inoltre dotate di numerose caratteristiche staminali, essendo capaci di generare, oltre l'endotelio e l'ematopoiesi, anche il mesenchima e i neuroni. Esperimenti preliminari, indicano che, nel sangue cordonale, la frequenza di cellule KDR⁺FLT1⁺TIE2⁺ risulta particolarmente abbondante, e dotata di caratteristiche staminali. Sono stati allestiti esperimenti per determinare il numero di progenitori e il potenziale differenziativo di queste cellule verso lo stipite ematopoietico, endoteliale, mesenchimale e neurale. Allo scopo di quantizzare le cellule staminali intermedie presenti nelle cordoni KDR abbiamo allestito colture a lungo termine su cellule staminali mesenchimali midollari selezionate per espressione di CD146. Sono inoltre in corso esperimenti *in vivo*, in topi NOD-SCID, per determinare il potenziale staminale ripopolante di queste cellule. Sono infine in preparazione *microarrays* dei microRNA espressi dalle cellule cordonali KDR.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi in questo progetto sono la migliore comprensione delle cellule cordonali KDR⁺ mediante la definizione delle capacità differenziative e autoreplicative delle stesse; in

particolare gli stipiti cellulari esplorati saranno: ematopoiesi, endotelio, mesenchima, osso, adipe, cartilagine, muscolatura liscia e striata, cardiomiociti, neuroni.

Altro risultato atteso è la definizione del numero di progenitori e cellule staminali multipotenti (capaci cioè di generare tutti gli stipiti descritti) o ristrette per alcuni stipiti (pluripotenti) oppure con il potenziale per un singolo stipite cellulare (unipotenti).

Trasferibilità dei risultati

Il numero particolarmente abbondante delle cellule cordonali KDR+, attualmente in corso di studio, le rende le candidate ideali per le terapie cellulari in varie patologie umane, principalmente di tipo vascolare, come il diabete mellito o l'infarto del miocardio. La identificazione, l'isolamento e la caratterizzazione funzionale e molecolare delle cellule cordonali KDR+ avrà delle importantissime ricadute sulla terapia cellulare di pazienti cardiopatici e di pazienti diabetici nel breve periodo. Le molteplici abilità differenziative delle cellule KDR+, se confermate e estese, predicono inoltre la loro possibilità di utilizzo in innumerevoli altre patologie umane.

La riattivazione della sintesi di emoglobina fetale in epoca post-natale: un modello di studio dello *switch* perinatale e un approccio sperimentale nella terapia della beta-talassemia

Lo scopo principale di questo progetto è quello di analizzare a fondo i meccanismi cellulari e soprattutto molecolari alla base della riattivazione della sintesi di HbF nell'adulto estendendo questo studio *in vitro* anche ai progenitori purificati dal sangue di soggetti beta-talassemici e dal cordone ombelicale. Utilizzando quindi sistemi di coltura unicellulari e unilinea gli obiettivi che il progetto si propone sono:

- valutazione della sintesi di HbF nelle colonie eritroidi generate da progenitori purificati dal sangue periferico adulto normale e di soggetti beta-talassemici cresciuti in presenza di KL±Dex;
- analisi dell'espressione dei più importanti fattori trascrizionali coinvolti nella differenziazione eritroide (GATA-1, Tal-1, Id-2, EKLF, FKLf, NF-E2) dalle fasi più precoci fino a quelle più tardive dell'eritropoiesi nelle condizioni di coltura di cui sopra. I risultati ottenuti nell'adulto normale saranno verificati nei progenitori di soggetti beta-talassemici e di cordone ombelicale;

- analisi dell'eventuale modulazione della HbF indotta da iper-espressione di alcuni fattori trascrizionali, in seguito a trasfezione genica degli stessi con vettori retrovirali e/o lentivirali nei progenitori eritroidi purificati;

- analisi dei meccanismi molecolari alla base dello *switch* perinatale.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base degli ottimi risultati ottenuti nell'adulto normale, lo studio della riattivazione dell'HbF verrà esteso ai progenitori purificati dal sangue periferico di soggetti beta-talassemici; ci aspettiamo, infatti, di poter ottenere una buona riattivazione *in vitro* anche in questi soggetti. Tale riattivazione potrebbe fornire un efficace trattamento per i pazienti con difetti di beta-globinosintesi. Nell'adulto normale il Dex è infatti attivo, in combinazione con il KL, a bassissimi dosaggi e, soprattutto, non presenta alcuna tossicità; tali studi *in vitro* potrebbero costituire la base per futuri *trials* clinici sui talassemici. Tra i risultati attesi nel triennio c'è, inoltre, la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dello *switch* perinatale valutando l'espressione dei fattori trascrizionali legati all'attivazione del *c-kit* nei progenitori eritroidi purificati dal sangue di cordone ombelicale e cresciuti nelle stesse condizioni sperimentali dell'adulto normale e dei soggetti beta-talassemici.

Oltre alla ricaduta in campo clinico, i risultati ottenuti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche ad alto livello nonché di presentazione a congressi specifici.

Trasferibilità dei risultati

Ci aspettiamo che questo studio possa fornire un'indicazione relativa al possibile utilizzo del KL ± Dex nel trattamento delle beta-emoglobinopatie e costituire la base per futuri *trial* clinici.

Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'ER nel carcinoma ovarico e in altre neoplasie

Il progetto si basa sulla massa a punto già effettuata nel nostro laboratorio di un *test* di chemioresistenza/chemiosensibilità *in vitro* che consente di valutare in maniera clinicamente predittiva il livello di chemioresistenza di cellule tumorali primarie. In particolare, questo *test* risulta particolarmente affidabile nell'ambito del carcinoma dell'ovaio. Il nostro progetto nei prossimi tre anni consisterà pertanto nella realizzazione di questo *test*, noto come *test* dell'"Extreme Drug Resistance", in circa 300 pazienti affette da carcinoma ovarico che verranno incluse in uno studio clinico multicentrico nazionale di fase III. In parallelo sono già stati attivati due filoni di ricerca basati sulla valutazione del potenziale terapeutico nel carcinoma ovarico di due nuove molecole: gli inibitori del proteasoma (in particolare, noi utilizzeremo il bortezomib, già introdotto in clinica nel trattamento del mieloma multiplo) e alcuni triterpenoidi sintetici (in particolare, il CDDO).

Risultati attesi nel triennio

Viene atteso nei prossime tre anni di attività di determinare quanto segue: i) di avere eseguito il *test* dell'ERA su circa 300 pazienti che afferiranno allo studio clinico su menzionato; ii) di determinare il meccanismo attraverso il quale il bortezomib e il CDDO inducono la morte di cellule di carcinoma ovarico; iii) di determinare i meccanismi molecolari della resistenza delle cellule di carcinoma ovarico ad alcuni chemioterapici, in particolare cisplatino e taxolo; iv) di determinare se l'espressione di alcuni geni anti-apoptotici nelle cellule di carcinoma ovarico correla e sia responsabile della resistenza ad alcuni chemioterapici e agli inibitori del proteasoma.

Trasferibilità dei risultati

La natura stessa degli studi da noi condotti implica un notevole grado di trasferibilità nel settore clinico.

Le cellule staminali post-natali multipotenti e ematopoietiche: caratterizzazione fenotipica-funzionale e espansione *ex vivo*

La nostra attività di ricerca è articolata in due progetti. Nel primo, proponiamo di valutare la capacità plastica delle CSE (in particolare CD34⁺/KDR⁺, CD34⁺/CD38⁻) purificate dal sangue di cordone o periferico umano, verso tessuti ectodermici (in particolare il tessuto nervoso), mesodermici (in particolare endotelio, muscolo scheletrico e cardiaco), e endodermici (tessuto epatico), utilizzando sia modelli *in vivo* (topi SCID-bg, NOD-SCID, pecora fetale) che *in vitro* (co-culture di CSE con cellule non ematopoietiche, e/o con il soprannatante di colture non ematopoietiche, e/o con fattori di crescita specifici per tessuti non ematopoietici). La capacità di transdifferenziare delle CSE umane nei modelli *in vitro* e *in vivo* sopra citati, paragonata a quella di cellule progenitrici di controllo (ad esempio, CD34⁺/KDR⁻) sarà valutata nelle cellule generate, mediante l'analisi dell'espressione di geni umani specifici (ad esempio, MyoD per il muscolo scheletrico, Troponina TNNI3 per il muscolo cardiaco, antigene nucleare umano) con tecniche di immunoistochimica e immunofluorescenza, microscopia confocale e RT-PCR. In taluni esperimenti *in vivo*, le CSE umane verranno marcate mediante vettori retrovirali, per facilitare il riconoscimento delle cellule umane prodotte e per valutare l'origine clonale della progenie multitissutale eventualmente generata. Nel secondo progetto, proponiamo di analizzare l'espressione di geni chiave dell'ematopoiesi (ad esempio, fattori di trascrizione come GATA-2,

Tal-1, PLZF; recettori come, *c-kit*, TpoR) nelle cellule staminali e progenitrici di diversa origine (CSE e progenitori ematopoietici del sangue periferico o del cordone, in particolare CD34+KDR+ CD34+KDR-; CS neurali da neurosfere in coltura) mediante RT-PCR, “*real time PCR*” e soprattutto mediante *microarrays*.

Risultati attesi nel triennio

Proponiamo di sviluppare modelli sperimentali di capacità plastica delle CSE (in particolare CD34+/- KDR+ e CD34+/-CD38-) verso tessuti ectodermici, mesodermici ed endodermici (ad esempio, endotelio, muscolo scheletrico e cardiaco), utilizzando sia modelli *in vivo* (topi NOD-SCID e SCID-bg, pecora fetale) che *in vitro* (co-culture di CSE con cellule non ematopoietiche). L’obiettivo finale è rappresentato dallo sviluppo di modelli preclinici di potenziale applicazione a livello clinico-terapeutico, in particolare per la terapia cellulare rigenerativa di forme morbose associate a danno cellulare di tessuti/organi della massima importanza funzionale (ad esempio, infarto del miocardio o malattie neurodegenerative). In base all’analisi dei geni espressi nelle CSE e nelle CS di diversa origine (ad esempio, CS neurali), cercheremo di identificare i geni chiave della autoreplicazione e plasticità staminali.

Le piastrine e il loro ruolo nella rigenerazione tissutale

Recentemente, molti lavori hanno messo in evidenza che le piastrine utilizzate per uso topico hanno un ruolo molto importante nella rigenerazione tissutale. I gel piastrinici accelerano la formazione di tessuto di granulazione, il differenziamento epiteliale e hanno un effetto sul riassorbimento e il rimodellamento dell’osso.

In Italia, la competenza della produzione del gel piastrinico è stata assegnata alle Strutture Trasfusionali (DM 3 marzo 2005 “Caratteristiche e modalità per la donazione del sangue e di emocomponenti”). Questa scelta rende più sicura la preparazione del gel piastrinico, in quanto le Strutture Trasfusionali possono eseguire i controlli di qualità necessari e garantire la qualificazione dell’intero processo di prelievo, preparazione, stoccaggio e assegnazione.

I meccanismi specifici alla base delle funzioni e del riparo cellulare e tissutale da parte del gel piastrinico non sono stati ancora chiariti. Il progetto si propone, attraverso studi *in vitro*, la caratterizzazione delle attività biologiche del gel piastrinico e, in collaborazione con alcuni Servizi Trasfusionali, di stabilire metodi, criteri, requisiti, limitazioni e indicazioni per la produzione del gel piastrinico e per il suo utilizzo clinico, coordinando lo sforzo degli specialisti di medicina trasfusionale per quanto concerne il prodotto, e gli specialisti di area clinica e chirurgica, per quanto riguarda il trattamento e l’efficacia terapeutica.

Risultati attesi nel triennio

Nel Decreto non si fa riferimento e non si dà indicazione su quali debbano essere i requisiti minimi del prodotto e le linee-guida e i criteri di valutazione sul buon uso del gel piastrinico per uso topico. I Servizi Trasfusionali e i Comitati per il Buon uso del Sangue, hanno gli strumenti per analizzare retrospettivamente i dati (di processo, di prodotto e i risultati clinici pertinenti) necessari a stabilire sia i requisiti minimi del prodotto che le linee guida e criteri di valutazione sul buon uso dell’emocomponente per uso topico. Da questo progetto ci si attende di poter fornire al Ministero una serie di dati oggettivi: a) sulle attività biologiche del prodotto, per stabilire criteri e limiti di utilizzo terapeutico; b) relativi alla qualità e alla qualificazione del nuovo emocomponente; c) su cui articolare criteri e indicazioni per il buon uso dell’emocomponente, valutando l’efficacia clinica degli interventi terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

Comprendere se e come funziona il gel piastrinico in condizioni cliniche, permetterà di redigere un protocollo che spieghi dettagliatamente come preparare e maneggiare le piastrine per ottenere e massimizzare il loro effetto sulla rigenerazione tissutale, al fine di armonizzare i

vare protocolli di preparazione di questo emocomponente per uso topico oggi in uso presso le Strutture Trasfusionali che già lo preparano.

Lo stress ossidativo e meccanico nell'invecchiamento eritrocitario

Lo scopo della ricerca è di valutare il ruolo dello *stress* ossidativo e meccanico in diverse condizioni di invecchiamento precoce del globulo rosso, come si osserva nelle anemie emolitiche ossidative, durante la conservazione in vitro a scopo trasfusionale e in presenza di protesi valvolari cardiache.

1. Studio del danno ossidativo nell'anemia falciforme (SCD), l'emoglobinopatia più frequente al mondo, la cui espressione più caratteristica è rappresentata dalle crisi dolorose vaso-occlusive, scatenate dalla falcizzazione degli eritrociti in ambiente a bassa pressione di ossigeno. La ridotta deformabilità delle cellule falcemiche provoca rallentamento del flusso, aggravamento dell'ischemia e ulteriore falcizzazione. Negli ultimi anni è stato suggerito che le modificazioni dell'ossidazione delle LDL siano un punto chiave nella sequenza di eventi che portano alle alterazioni vascolari correlate con l'aterogenesi. In SCD alcune condizioni particolari, come l'attivazione dell'omeostasi del ferro, l'interazione tra eritrociti lisati e LDL, la diminuzione delle difese antiossidanti, potrebbero promuovere il danno ossidativo a livello delle LDL e predisporre al danno vascolare.

2. Valutazione della sensibilità delle emazie allo *stress* meccanico indotto nelle diverse fasi di preparazione dei concentrati per trasfusione: la presenza di emolisi nei preparati di globuli rossi per trasfusione determina l'impossibilità di utilizzo del preparato e la sua eliminazione con evidente dispendio di sangue.

3. Valutazione della sensibilità dei globuli rossi allo *stress* meccanico indotto dall'impianto di protesi valvolari cardiache. La presenza di tali dispositivi determina alterazioni reologiche del sangue e diminuzione della deformabilità eritrocitaria. I cambiamenti emoreologici sono imputabili al trauma che il flusso turbolento e l'impatto del dispositivo provocano sulle emazie. Suscettibili agli *stress* meccanici, gli eritrociti subiscono cambiamenti tali da indurre una senescenza precoce ed emolisi, determinando spesso un quadro di anemia emolitica.

Risultati attesi nel triennio

1. In pazienti affetti da SCD, sia trasfusione dipendenti, per pregressi fenomeni ischemici e/o tromboembolici, che non trasfusione dipendenti, verranno studiati il profilo ematologico, la presenza di alfa talassemia e/o l'attivazione dei geni gamma, il profilo coagulativo di base, la presenza di fattori genetici trombofilici (mutazioni dei geni che codificano per MTHFR, HPA-1, FV:Q Leiden), il danno ossidativo eritrocitario, l'ossidabilità delle LDL, il contenuto in vitamine antiossidanti e il profilo emoreologico come viscosità ematica rotazionale e viscoelasticità. Questi parametri verranno messi in relazione allo stato clinico, alle terapie farmacologiche e agli eventi vaso-occlusivi pregressi.

2. Sarà effettuata una valutazione dell'emolisi durante la preparazione dei concentrati di globuli rossi per trasfusione prendendo in esame le possibili cause scatenanti: malattie congenite del donatore, modalità di prelievo e conservazione prima della separazione, *stress* meccanico durante il frazionamento e condizioni di conservazione dei preparati.

3. Studio della sensibilità delle emazie per trasfusione allo *stress* meccanico indotto dalla presenza protesi valvolari cardiache per valutare il potenziale emolitico di questi dispositivi non solo attraverso l'indice di emolisi ma anche evidenziando il danno prodotto nell'eritrocita analizzando diversi parametri metabolici e strutturali significativi di invecchiamento eritrocitario.

Trasferibilità dei risultati

1. Per quanto riguarda lo studio del danno ossidativo nell'anemia falciforme, la ricerca migliorerà la comprensione della fisiopatologia della malattia, fornirà un quadro complessivo delle varie componenti che concorrono alla variabilità dell'espressione clinica della malattia e si potranno individuare nuovi parametri utili per la prevenzione degli eventi ischemici e/o tromboembolici e per il monitoraggio terapeutico.

2. Per quanto riguarda la valutazione della sensibilità delle emazie allo *stress* meccanico indotto nelle diverse fasi di preparazione dei concentrati per trasfusione, la ricerca fornirà informazioni sui momenti critici del frazionamento dei globuli rossi, darà indicazioni sulla presenza nei donatori di difetti congeniti eritrocitari e sull'influenza di tali difetti congeniti sulla efficienza trasfusionale.

3. Per quanto riguarda la valutazione della sensibilità dei globuli rossi allo *stress* meccanico indotto dalla presenza di protesi valvolari cardiache, la ricerca potrà dare indicazioni sul danno eritrocitario indotto dalle protesi e fornire nuovi indicatori di emolisi utili per eventuali studi su nuovi dispositivi.

Manipolazione *ex vivo* delle cellule staminali: applicazione in modelli preclinici e clinici di terapia trapiantologica rigenerativa e trasfusionale

Il trapianto di cellule staminali e la trasfusione di sangue, o di altre popolazioni ematopoietiche, rappresentano presidi terapeutici fondamentali. Tuttavia, il loro utilizzo viene ostacolato da una serie di limitazioni tecnico-scientifiche, quali la scarsità dei donatori e la possibilità di infondere nel ricevente cellule patologiche (ad es., cellule tumorali in pazienti affetti da neoplasie). Questo progetto mira ad affrontare alla radice taluni di questi aspetti, attraverso l'isolamento e la manipolazione *ex vivo* delle cellule staminali ematopoietiche: il fine ultimo è di produrre *in vitro* i processi proliferativi-differenziativi ematopoietici, quali si realizzano *in vivo* nei donatori di cellule staminali, progenitrici o terminali circolanti.

Risultati attesi nel triennio

Nel biennio

Utilizzazione delle progenie delle cellule staminali, isolate e manipolate *ex vivo*, in terapia clinica: specificamente, a fini di trapianto (ad esempio, espandendo le cellule staminali di cordone ombelicale, in modo da ottenerne una quantità sufficiente per il trapianto allogenico in soggetti adulti) e di infusione (ad esempio, differenziando le cellule staminali autologhe in progenitori e infondendo questi ultimi dopo terapie mielosoppressive, per attenuare la fase critica di citopenia nel sangue periferico).

Meccanismi responsabili della sopravvivenza cellulare nella ematopoiesi normale e leucemica

I principali ostacoli che limitano l'efficacia delle terapie antineoplastiche attualmente disponibili sono rappresentati dagli effetti tossici della chemioterapia nei confronti delle cellule ematopoietiche normali, e contemporaneamente dalla resistenza ai farmaci chemioterapici di una popolazione di cellule staminali leucemiche in grado di rigenerare il tumore. I nostri studi sono finalizzati al miglioramento delle terapie attualmente disponibili attraverso una migliore comprensione dei meccanismi che regolano la sensibilità delle cellule ematopoietiche normali e neoplastiche agli agenti chemioterapici. Recentemente abbiamo identificato una citochina in grado di proteggere le cellule progenitrici eritroidi dall'azione dei farmaci citotossici e stiamo estendendo i nostri studi a cellule primarie granulocitarie e megacariocitarie. Sono attualmente in corso esperimenti *in vitro* volti a definire i processi molecolari innescati da questa citochina e

studi *in vivo* per verificare l'efficacia nella protezione dalla mielosoppressione conseguente a chemioterapia.

Ulteriori ricerche sono volte ad individuare i meccanismi di resistenza agli stimoli citotossici messi in atto da cellule staminali/progenitrici derivate da leucemie e patologie preneoplastiche del sistema ematopoietico, in modo da poter progettare e sperimentare strategie terapeutiche mirate all'eliminazione specifica di tale popolazione e quindi all'eradicazione definitiva della neoplasia.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione degli eventi molecolari attivati da citochine e coinvolti nella protezione delle cellule ematopoietiche da farmaci chemioterapici. Definizione di strategie terapeutiche sperimentali volte alla protezione del compartimento ematopoietico dall'azione tossica dei chemioterapici. Identificazione di profili genetici e molecolari di cellule staminali/progenitrici derivate da pazienti con disordini preneoplastici e neoplastici del sistema ematopoietico e identificazione di geni potenzialmente coinvolti nel processo di trasformazione tumorale. Validazione del ruolo leucemogenetico di tali geni attraverso l'espressione esogena in cellule staminali/progenitrici ematopoietiche normali.

Megacariocitopoiesi e trombopoiesi fetale e adulta

Le cellule ematopoietiche derivate da sangue di cordone sono impiegate per il trapianto, in alternativa alle cellule derivate da midollo e da sangue periferico. Le cellule fetali, pur avendo numerosi vantaggi, presentano alcune limitazioni che ne rendono l'impiego limitato e controverso. Uno degli aspetti più critici è rappresentato dal ritardo *nell'engraftment* della componente MK, con conseguente stato trombocitopenico prolungato poiché la comparsa in circolo delle piastrine richiede una media di 70 giorni rispetto ai 20 che si osservano dopo trapianto con cellule di sangue periferico mobilizzato. Questi pazienti hanno bisogno di terapia trasfusionale con concentrati piastrinici che li espone a rischi di natura immunologica e infettiva.

L'obiettivo principale del progetto è lo studio degli aspetti molecolari che sono alla base del diverso grado di maturazione raggiunto dai megacariociti (MK) derivati da cellule ematopoietiche di sangue di cordone ombelicale rispetto a quelli derivati da sangue periferico, con particolare attenzione al processo di ploidizzazione e alla capacità delle cellule a maggior contenuto di DNA di rilasciare un maggior numero di piastrine, emostaticamente funzionanti.

Saranno utilizzati sistemi di *macroarrays* per l'individuazione di geni specifici del ciclo cellulare che potrebbero essere espressi in modo differente fra i megacariociti poliploidi derivati da sangue periferico e i megacariociti diploidi originati da sangue di cordone.

Risultati attesi nel triennio

Differente espressione di proteine del ciclo cellulare che regolano il processo endomitotico e che possono essere alla base del diverso grado di maturazione tra cellule di sangue periferico e di cordone.

Ottimizzazione dell'amplificazione *in vitro* di cellule CD34+ da cordone con fattori di crescita che, in associazione con la trombopoietina, siano in grado di aumentare sia il numero di cellule totali che la componente megacariocitaria.

Megacariocitopoiesi e trombopoiesi efficace realizzata in modelli di NOD/SCID trapiantati con progenitori ematopoietici amplificati *ex vivo*.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno essere utili sia per lo sviluppo di nuove strategie di espansione *ex vivo* di cellule ematopoietiche fetali da utilizzare per il trapianto in soggetti adulti, sia per ridurre il tempo di trombocitopenia associata al trapianto di sangue di cordone e, indirettamente, il rischio di natura immunologica e infettiva associato alle trasfusioni.

Ricerca su nuovi prodotti naturali con effetto anti-aterogeno

Le politiche di sviluppo pongono particolare attenzione allo sviluppo di collaborazioni in ogni campo con le popolazioni dell'area del Mediterraneo. In questo ambito è in atto una collaborazione tecnico-scientifico tra il nostro Istituto e l'Università del Marocco nel settore delle malattie cardiovascolari.

L'aterosclerosi è oggi considerata una conseguenza a lungo termine di una condizione infiammatoria delle arterie che facilita e modula la deposizione di lipidi nella parete vasale. Le malattie cardiovascolari ad essa correlate rappresentano la causa principale di mortalità in Italia e anche in Marocco è responsabile del 40% dei decessi in età 45-54 anni. In questi Paesi, la sua incidenza aumenta con il miglioramento delle condizioni socio-economiche.

L'uso di piante medicinali resta a tutt'oggi una risorsa importante per i Paesi in via di sviluppo e in Marocco la maggioranza della popolazione si rivolge con favore alla medicina tradizionale. La medicina tradizionale prescrive numerose estratti da piante autoctone, quali, in particolare di *Erica Multiflora* e dell'*Ocimum Basilicum*, per la riduzione dei livelli lipemici plasmatici e per la prevenzione dell'aterosclerosi. La rilevanza di tale attitudine spinge la ricerca in questo campo, e pone l'esigenza sanitaria, sociale e soprattutto scientifica di verificare l'opportunità di tali trattamenti. In particolare, si tratta di verificare sia l'eventuale effetto ipolipidemico sia gli eventuali effetti negativi e tossici derivanti da tali somministrazioni. La individuazione, infine, degli eventuali principi ipolipidemici presenti in tali piante, porrebbe anche le basi per lo sviluppo di ulteriori principi farmaceutici.

Nel caso della erica (*Erica Multiflora*) e del basilico (*Ocimum Basilicum*) le loro potenzialità ipocolesterolemica e le loro attività a livello della parete vasale restano inesplorate. La loro prescrizione da parte dell'erborista è empirica e manca una valutazione sperimentale della efficacia ipolipidemica, degli effetti sulle funzioni delle cellule vasali e sul metabolismo lipidico.

Risultati attesi nel triennio

L'impiego di sostanze naturali nella prevenzione e terapia è auspicabile non solo per motivi antropologici, ma anche perché l'identificazione di principi attivi isolati da piante e funghi è stata spesso alla base delle scienze farmacologiche. Tuttavia un impiego empirico non supportato da opportuna ricerca, sia di base che applicata, può non solo non condurre a miglioramento, ma può nuocere alla salute umana. Da queste premesse nasce l'esigenza di caratterizzare nel dettaglio le proprietà delle molecole isolabili da estratti vegetali e soprattutto di determinarne le reali capacità di incidere sui fattori che determinano il rischio di malattia cardiovascolare. Da tale progetto, che congiuntamente mette a frutto le competenze dei ricercatori marocchini con quelle del gruppo italiano, si potranno ottenere indicazioni sulle capacità di dette molecole isolate dal basilico e dall'erica, due piante facenti parte delle piante medicamentose e ampiamente distribuite nell'*habitat* naturale dei 2 Paesi, di modulare i livelli lipemici e le funzioni delle cellule dell'intima vasale. In particolare, nel primo anno di attività è stata effettivamente provata la capacità ipolipidemizzante di estratti acquosi di *Ocimum basilicum* in un modello sperimentale animale. Inoltre, si è dimostrata una notevole capacità inibitoria della sintesi del colesterolo e della sua esterificazione nel modello cellulare di macrofagi umani derivati da monoliti (HMDM). I promettenti risultati preliminari stanno dando impulso alla ricerca dei componenti responsabili di queste attività ipocolesterolemizzanti, e, con il progredire della ricerca ci si attende di purificare, almeno parzialmente i principi attivi responsabili di tali azioni.

Trasferibilità dei risultati

La identificazione di eventuali principi negli estratti acquosi e/o etanolici di *Ocimum basilicum* avrebbe il vantaggio di poter proporre dei brevetti per nuove sostanze farmacologiche

ad azione ipocolesterolemizzante. Inoltre, gli studi condotti forniranno maggiori informazioni sui possibili e eventuali effetti collaterali di questi estratti nei diversi modelli sperimentali testati.

Ruolo dei derivati dell'arsenico nel trattamento delle neoplasie

Studi recenti hanno indicato che i derivati dell'arsenico, e in particolare il triossido dell'arsenico, possono essere utilizzati con successo nel trattamento di alcune neoplasie. In particolare, è stata mostrata una considerevole efficacia del triossido dell'arsenico nel trattamento della leucemia acuta promielocitica. In particolare, noi proponiamo di valutare l'effetto del triossido d'arsenico sull'ematopoiesi umana normale, utilizzando come *tool* sperimentale cellule CD34+ purificate da sangue di cordone e coltivate in condizioni che ne determinano il differenziamento selettivo verso i vari *lineage* emopoietici. In parallelo verranno studiati gli effetti pro-apoptotici del triossido di arsenico su cellule leucemiche primarie e su cellule primarie di carcinoma ovarico. Particolare enfasi verrà riposta all'analisi degli effetti del triossido d'arsenico sull'attivazione della via apoptotica estrinseca e intrinseca.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi durante il triennio di attività possono essere così riassunti: i) valutazione degli effetti del triossido d'arsenico sull'ematopoiesi normale, con analisi dei meccanismi molecolari responsabili di tali effetti; ii) valutazione dei meccanismi molecolari attraverso i quali il triossido d'arsenico induce apoptosi delle cellule tumorali; iii) valutazione degli effetti anti-tumorali del triossido d'arsenico in tumori chemioresistenti.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi da noi condotti potrebbero avere delle interessanti implicazioni per l'utilizzo del triossido d'arsenico in terapia oncologica.

Ruolo dei recettori dei fattori di crescita e della transferrina nell'ematopoiesi normale e leucemica

Gli obiettivi principali delle nostre ricerche future in questo settore consistono in due filoni di ricerca: a) studio dei meccanismi che regolano l'espressione della catena alfa e beta del recettore dell'interleuchina-3 (IL-3) nelle leucemie acute mieloidi (LAM); b) studio della funzione del recettore 2 della transferrina. Riguardo al primo filone di ricerca particolare enfasi verrà riposta allo sviluppo dei seguenti temi di ricerca: i) utilizzo di una proteina chimerica costituita dall'IL-3 fusa con la tossina difterica (IL3/DT) per ottenere il *killing* dei blasti di LAM con elevata espressione dei recettori dell'IL-3; ii) analisi immunofenotipica delle LAM associate ad una elevata espressione della catena beta del recettore dell'IL-3; iii) caratterizzazione molecolare e funzionale di un complesso recettoriale formato dalla catena beta del recettore dell'IL-3 e del recettore 2 del VEGF. Per quanto riguarda il secondo filone di ricerca verranno sviluppati due temi di ricerca: studio del *signaling* di membrana originato dall'attivazione del recettore 2 della transferrina in cellule epatiche e in cellule tumorali; analisi dell'espressione e del possibile ruolo oncogenetico del recettore 2 della transferrina in tre modelli tumorali (carcinoma dell'ovaio, melanomi e carcinomi del colon): studi su linee cellulari e in tumori primari.

Risultati attesi nel triennio

Riguardo al primo filone di ricerca ci aspettiamo: i) di dimostrare che i blasti leucemici di LAM vengono indotti ad apoptosi dalla proteina di fusione IL3/DT in base ai livelli d'espressione della catena alfa e beta del recettore dell'IL-3; ii) di partecipare a uno studio clinico di fase I/II basato sull'utilizzo di IL3/DT in pazienti leucemici con malattia in stadio

avanzato e non responsivi alle terapie *standard* e di potere riportare i risultati clinici relativi a questo studio; di caratterizzare da un punto di vista fenotipico, biologico e prognostico le LAM associate ad un'elevata espressione della catena beta del recettore dell'IL-3. Riguardo al secondo filone di ricerca noi si aspettiamo di: i) avere determinato il tipo di *signaling* originato sulla membrana cellulare in seguito ad attivazione del recettore 2 della transferrina; ii) avere studiato la localizzazione del recettore 2 della transferrina a livello di vari compartimenti membranari; iii) caratterizzare le neoplasie associate ad una elevata espressione di questo recettore.

Trasferibilità dei risultati

I risultati da noi ottenuti potrebbero avere una buona trasferibilità nel settore biomedico oncologico. In particolare gli studi di cui al punto 1 potrebbero avere ricadute dirette nello sviluppo di nuove terapie per le leucemie acute mieloidi non più suscettibili di trattamento con le terapie convenzionali. Gli studi di cui al punto 2 potrebbero avere implicazioni diagnostico/prognostiche per alcune neoplasie.

Ruolo del fattore di crescita delle cellule endoteliali (VEGF) sulla differenziazione unilinea di progenitori ematopoietici umani e su cellule dendritiche derivate da monociti maturi

Gli obiettivi della nostra ricerca sono: 1) analizzare l'espressione dei recettori e il rilascio di VEGF nel sistema ematopoietico. In particolare verrà studiata l'espressione dei recettori Flt-1, KDR, nonché il rilascio di VEGF da parte dei *lineage* dendritico, monocitario, granulocitario, eritroide e megacariocitario nei diversi stadi differenziativi; 2) studiare gli effetti della famiglia delle chemochine VEGF sulle cellule ematopoietiche. Valuteremo gli effetti del VEGF sulle linee ematopoietiche che esprimono uno o più recettori; 3) valutare il ruolo svolto dalle molecole antagoniste del VEGF nell'ematopoiesi normale. Verificheremo se cellule ematopoietiche sono in grado di rilasciare sFlt-1 la cui attività antagonista al VEGF è già stata descritta; 4) valutare eventuali differenze nella capacità transmigrotoria e confrontare la produzione di chemochine rilevanti per tale attività (MIP-1alfa, MIP-1beta, RANTES e eventualmente VEGF) in quanto la capacità chemotattica delle DC è fondamentale per lo svolgimento della loro funzione; 5) valutare l'espressione dei recettori del VEGF sulle DC ottenute con diversi sistemi differenziativi, ai vari stadi maturativi, nonché valutare l'effetto di VEGF esogeno sulla loro differenziazione e sulle caratteristiche fenotipiche e funzionali. Infatti è stato riportato che il VEGF determina un blocco della differenziazione in senso dendritico delle cellule CD34+, provocando sia una riduzione del numero di DC competenti che un accumulo di forme immature suggerendo, pertanto, una strategia tumorale particolarmente efficiente che attraverso la produzione di una sola citochina induce la neoangiogenesi, indispensabile alla crescita tumorale, e inibisce la risposta immunitaria.

Risultati attesi nel triennio

studio degli effetti della famiglia delle chemochine VEGF sulle cellule ematopoietiche mediante neutralizzazione con anticorpi bloccanti del VEGF endogeno ed esogeno;

valutazione del ruolo svolto dalle molecole antagoniste del VEGF nell'ematopoiesi normale, con particolare riguardo a sFlt-1;

valutazione dell'espressione dei recettori del VEGF Flt-1, KDR sulle DC, ottenute con diversi sistemi differenziativi (da CD34+ o monociti maturi), ai vari stadi maturativi, nonché valutazione dell'effetto del VEGF esogeno sulla loro differenziazione e sulle caratteristiche fenotipiche e funzionali.

Ruolo del fattore di trascrizione Ets-1 durante il differenziamento ematopoietico e caratterizzazione dei meccanismi molecolari che ne regolano l'attività

L'ematopoiesi è un processo altamente regolato dove da cellule staminali ematopoietiche auto-rigeneranti e pluripotenti si originano le diverse cellule del sangue. La crescita e la maturazione delle linee eritroidi, granulocitiche, monocitiche e megacariocitiche è controllata da combinazioni di fattori trascrizionali che regolano promotori o *enhancers* presenti su specifici geni *target*. I fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia Ets giocano un ruolo importante nell'ematopoiesi. Abbiamo recentemente dimostrato che Ets-1 stimola il differenziamento megacariocitario mentre la diminuzione della sua espressione è necessaria per la maturazione delle cellule eritroidi. Esperimenti futuri saranno volti a caratterizzare il ruolo di Ets-1 durante il differenziamento monocitario e granulocitario. Le funzioni di Ets-1 sono regolate da varie modificazioni post-trascrizionali (i.e. fosforilazioni che possono inibire o aumentare la capacità di trans-attivazione). La regolazione dell'espressione di Ets-1 potrebbe avvenire anche tramite il blocco della traduzione dell'mRNA attraverso i microRNA (miR). I miR sono una famiglia di piccoli RNA non codificanti che inibiscono la traduzione di specifici geni *target*. I miR determinano silenziamento genico, appaiandosi con regioni di omologia presenti su mRNA bersaglio, e interferendo con la loro traduzione. Nell'uomo sono stati identificati circa 250 miRNA, ma attualmente i geni *target* sono in gran parte sconosciuti. L'analisi bioinformatica suggerisce che nell'uomo i miR155, 221, 222 hanno come *target* Ets-1. Esperimenti saranno condotti per valutare se Ets-1 è un *target* dei miR155, 221, 222 e valutare un eventuale ruolo biologico di questi miR nell'ematopoiesi.

Risultati attesi nel triennio

I) Studio del ruolo di Ets-1 durante il differenziamento monocitario e granulocitario. Cellule CD34+ purificate da sangue periferico o da sangue di cordone ombelicale umani saranno infettate con vettori retrovirali esprimenti Ets-1 e successivamente coltivate in terreni di coltura unilinea. Parallelamente saranno condotti anche esperimenti di *knock-down* tramite siRNA. II) Per analizzare se Ets-1 è un *target* dei miR155, 221, 222 il 3' UTR di Ets-1 sarà amplificato tramite PCR da DNA genomico e clonato a valle del gene luciferasi contenuto nel plasmide pGL3-promoter. Questo costrutto verrà co-trasfettato con i suddetti miR o con sequenze miR di controllo (i.e. *scramble* miR) in linee cellulari tramite lipofectamina. Dopo 48 ore i livelli di luciferasi verranno determinati. Dopo aver dimostrato che i miR 155, 221, 222, sono in grado di regolare il 3' UTR di Ets-1, verrà analizzato l'effetto della loro *over*-espressione nel differenziamento megacariocitario. A vari tempi di coltura le cellule saranno trasfettate con i differenti miR e relativi *scramble* miR tramite lipofectamina. A diversi tempi dalla trasfezione valuteremo l'effetto dei miR analizzando gli eventuali cambiamenti della proliferazione cellulare, morfologia, immunofenotipo, ciclo cellulare e apoptosi, in cellule trasfettate rispetto a cellule contenenti gli oligo-*scramble*. Successivamente valuteremo se l'espressione ectopica stabile del miR 222 ha effetti sulla proliferazione e il differenziamento megacariocitario. III) Dopo aver caratterizzato il ruolo di Ets-1 durante il differenziamento monocitario e granulocitario valuteremo anche in questi *lineages* gli effetti dell'espressione ectopica stabile del miR 222.

Ruolo del fattore di trascrizione Gata1 nell'ematopoiesi normale e patologica, incluse le sindromi mieloproliferative

Questo laboratorio è stato tra i pionieri nell'identificare il ruolo determinante svolto dal fattore di trascrizione Gata1 non solo per la corretta differenziazione delle cellule eritroidi (Vannucchi AM et al, Blood 97:3040-3050, 2001), megacariocitarie (Centurione L et al, Blood, 104:3573-3579, 2004, Vannucchi AM et al, Blood, 2005; 105: 3493-3501) e mastocitarie

(Migliaccio AR, et al. J Exp. Me. 197:281-296, 2003), ma anche nello scoprire come questo gene sia determinante per la corretta funzionalità delle cellule staminali e dei progenitori emopoietici (Sanchez M et al, Stem Cells, in press; Martelli F et al, Blood, 2005; 106:4102-4113). Alterazioni strutturali ereditarie di Gata1 determinano anemie e piastrinopenie congeniche, incluse alcune forme di talassemia (Migliaccio AR et al, NY Acad Sci, 2005; 1044:142-158; Migliaccio AR et al, Curr Imm Rev, in press). Alterazioni somatiche nella struttura e nei livelli di espressione di Gata1 sono invece associate a leucemie e sindromi mieloproliferative, quali la sindrome mieloproliferativa transiente del neonato o la mielofibrosi idiopatica nell'adulto (Vannucchi A et al, Blood, 100: 1123-1132, 2002, Plenary Paper). Nei prossimi tre anni, ci proponiamo di usare una combinazione di approcci di genetica formale, di ematologia sperimentale e di biologia strutturale per identificare il *pathway* biologico con cui Gata1 influenza l'ematopoiesi normale e patologica.

Risultati attesi nel triennio

L'attività di ricerca userà, tra l'altro, un modello murino portatore di una mutazione ipomorfica a carico del fattore di trascrizione Gata1 (mutazione Gata1low). La mutazione Gata1low induce nei topi adulti un fenotipo complesso che comprende non solo anomalie nel *pathway* di differenziazione eritroide ma anche aumentata apoptosi nel compartimento dei mastociti tissutali immaturi e insorgenza di un quadro patologico simile alla mielofibrosi umana, una sindrome mieloproliferativa di origine clonale la cui eziologia è ancora sconosciuta. Si propongono per i prossimi tre anni obiettivi specifici:

Dimostrare che la mutazione Gata1low è direttamente responsabile per lo sviluppo della mielofibrosi nel modello murino della malattia e chiarire se alterazioni simili siano presenti anche nei pazienti con mielofibrosi idiopatica.

Definire il ruolo esercitato dai megacariociti alterati nello sviluppo non solo della fibrosi midollare ma anche nell'intero quadro delle alterazioni che accompagnano lo sviluppo della malattia.

Caratterizzare l'estensione delle anomalie nella mobilizzazione e traffico delle cellule staminali e dei progenitori indotte dalla mutazione ipomorfica Gata1low.

Identificare agenti farmacologici per il trattamento di ciascuno stadio della malattia nei topi Gata1low.

Identificare il ruolo di Gata1 nella differenziazione mastocitaria e nelle allergie.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti saranno trasferiti alla comunità scientifica come pubblicazioni scientifiche e alle associazioni dei pazienti e al Servizio Sanitario Nazionale in quanto identificheranno possibili target terapeutici nelle malattie mieloproliferative e nelle allergie.

Ruolo del recettore KDR nella megacariopoiesi

È stato dimostrato che il recettore 2 del *Vascular Endothelial Growth Factor*, KDR promuove l'autoreplicazione e la sopravvivenza delle cellule ematopoietiche primitive. Inoltre, il recettore del VEGF favorisce l'espansione e la migrazione delle cellule leucemiche. In particolare, È noto che il trattamento con inibitori del KDR regola negativamente la sopravvivenza dei blasti leucemici. Il KDR sembra svolgere un ruolo cruciale anche a stadi di sviluppo più avanzati. Infatti, abbiamo recentemente dimostrato che nei progenitori ematopoietici della linea cellulare tumorale TF1, il KDR promuove la proliferazione e il differenziamento megacariocitario (MK). Inoltre, abbiamo osservato che i progenitori MK normali esprimono il KDR e producono il suo ligando VEGF, suggerendo che il KDR potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nella megacariopoiesi. La conoscenza del possibile ruolo svolto dal KDR nella proliferazione e nel differenziamento MK può costituire una risorsa importante

per modulare la megacariopoiesi sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Pertanto, ci proponiamo di analizzare l'effetto della stimolazione e dell'inibizione specifica del KDR sui progenitori MK. Inoltre, con l'intento di identificare molecole bersaglio del KDR e coinvolte nella megacariopoiesi, analizzeremo i segnali innescati dall'attivazione del KDR.

Risultati attesi nel triennio

Al fine di ottenere colture virtualmente pure di progenitori MK (*unilineage*), coltiveremo progenitori ematopoietici CD34+ in condizioni selettive per la loro crescita.

Con lo scopo di stimolare o inibire specificamente il KDR, i progenitori ematopoietici verranno trattati con ligandi recettore-specifici o anticorpi bloccanti specifici. Nella popolazione MK così trattata sarà successivamente saggiata la proliferazione, il differenziamento (analisi dell'espressione di marcatori fenotipici) e la maturazione MK (analisi della presenza di cellule con nuclei polilobati).

Dalle colture *unilineage* si otterranno popolazioni a diversi stadi di differenziamento e maturazione. Tali popolazioni saranno successivamente saggiate per identificare le molecole attivate dal KDR e che sono coinvolte nei diversi *step* del differenziamento.

Sulla base dei risultati ottenuti in altri sistemi sperimentali, ci aspettiamo che il KDR promuova la proliferazione e successivamente il differenziamento MK attivando rispettivamente i *pathways* della PI3 chinasi e delle MAP chinasi.

Ruolo della cav-1/caveola nel differenziamento ematopoietico adulto

La caveola è un organello della plasmamembrana in grado di concentrare e pre-assemblare molecole segnale (EGF-R, FGF-R, PDGF-R, VEGFR, PKC, MAPK, H-ras, shc, Grb-2) in complessi sopra-molecolari a seguito di interazione con scaffolding domain di proteine *marker* caveoline 1,2, 3. Il sistema ematopoietico adulto normale è privo di cav-1 /caveola con l'unica eccezione dei megacariociti. In esperimenti preliminari abbiamo riscontrato l'espressione di cav-1 in estratti totali di progenitori quiescenti CD34+ isolati da sangue periferico adulto, a indicare l'esistenza di una *down* modulazione della cav-1 durante il differenziamento emopoietico in linea con la sua funzione di regolatore negativo di molecole segnale, dapprima inattive in stato di quiescenza cellulare e poi stimolate dai vari fattori linea specifici.

VEGFR-2 È un recettore ad attività tirosin chinasi intrinseca espresso su progenitori alti. In cellule endoteliali studi di associazione diretta cav-1/VEGFR-2 hanno indicato un ruolo regolatorio della cav-1 nella via di segnale del VEGFR. In particolare la cav-1 fungerebbe da inibitore dell'attivazione del VEGFR in condizioni di quiescenza cellulare, o da substrato in condizioni di attivazione da ligando. Nel secondo caso l'attivazione della cav-1 in un residuo di tirosina (Y 14), sembrerebbe dipendente dall'attività della chinasi SRC. Ad oggi non sono noti studi di regolazione reciproca cav-1/VEGFR-2 nel sistema emopoietico. Dal momento che Cav-1 e VEGFR-2 sono entrambe espresse in cellule emopoietiche indifferenziate, ipotizziamo una associazione /regolazione funzionale nelle varie fasi del differenziamento emopoietico adulto di progenitori CD34+/KDR+.

Risultati attesi nel triennio

La nostra ipotesi di lavoro prevede un ruolo della cav-1 endogena sulla regolazione omeostatica del progenitore CD34+/KDR+ isolato da sangue periferico. Saggi di purificazione di cellule CD34+/KDR+ sviluppati nel nostro laboratorio consentiranno di ottenere una popolazione omogenea con cui si allestiranno colture differenziate selettive *in vitro* a mezzo di citochine specifiche. Verificheremo l'espressione caveolare endogena in cinetiche di differenziazione eritroide, monocitaria, granulocitaria, e megacariocitaria. Successivi esperimenti di *over* espressione stabile della cav-1 (con vettori retrovirali PINCO/GFP) in progenitori CD34+/KDR+ seguita da analisi di curve di crescita e morfologica consentiranno di

individuare in popolazioni pure un ruolo della cav-1 in uno specifico stadio maturativo, mediante alterazioni dei *pathway* di trasduzione del segnale (MAPK, erk1/2). Un eventuale ruolo della cav-1 potrà essere confermato da studi *in vivo* su topi geneticamente modificati, Knockout o *over* espressioni cav-1.

Quindi verificheremo il ruolo regolatorio della cav-1 nell'attivazione del VEGFR-2 a vari stadi differenziativi linea-specifici mediante anticorpi anti cav-1, P-cav, VEGFR-2, c-src, c-src attivo (Y416), c-src inattivo (Y527) (western blotting, immunoprecipitazione, immunofluorescenza). Quindi verificheremo con inibitori altamente specifici della fosforilazione del VEGFR (Su 5416) e del c-src (PP1, PP2) la specificità del segnale in studio. Inoltre la rimozione della cav-1 a mezzo della distruzione della caveola con metil-biclodestrina consentirà di stabilire eventuali effetti della cav-1 su segnali proliferativi.

Studio *in vitro* sugli effetti pleiotrofici e sul metabolismo lipidico della rosuvastatina nel modulare l'interazione tra cellule e lipoproteine aterogene isolate da pazienti eterozigoti per l'ipercolesterolemia familiare

La formazione della lesione aterosclerotica è un complesso processo mediato da processi infiammatori e meccanismi di ossidazione lipidica. Le *foam cells*, un *marker* precoce di lesione vasale sono macrofagi reclutati dalle arterie che immagazzinano lipidi mediante *uptake* non-regolato di lipoproteine modificate e non-modificate. Inoltre il macrofago modula la risposta immune e infiammatoria mediante secrezione di citochine e molecole chemotattiche, nonché attraverso l'espressione di molecole di adesione che regolano la loro interazione con l'endotelio. Pertanto, il macrofago è un sistema cellulare che offre molti vantaggi per lo studio degli effetti pleiotrofici e metabolici di farmaci destinati alla terapia e prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Le statine sono inibitori della sintesi di colesterolo che rappresentano il sussidio farmacologico più utilizzato nella terapia delle ipercolesterolemie. È stato ampiamente dimostrato, inoltre, che molti degli effetti positivi espletati dalle statine sono imputabili a una pletera di effetti minori a carico delle funzioni vasali, in particolare endotelio e macrofagi, denominati effetti pleiotrofici.

A parità di dosaggi, molti studi hanno dimostrato che la rosuvastatina, molecola di nuova generazione, è la statina con maggiore proprietà ipocolesterolemizzante. Nel caso della rosuvastatina, gli effetti pleiotrofici espletati a livello del macrofago e della interazione macrofago-endotelio sono stati scarsamente investigati, mentre è stata descritta una sua attività ipo-triglicidemia, che, finora, è stata raramente riscontrata con l'uso di altre statine.

Risultati attesi nel triennio

Lo scopo di questo studio è quello di valutare il ruolo della rosuvastatina sulle funzioni maggiormente rilevanti del macrofago in relazione allo sviluppo della lesione vasale.

Gli effetti della rosuvastatina saranno testati in macrofagi sottoposti allo stimolo aterogeno rappresentato da LDL (Hz-LDL) isolate da pazienti eterozigoti per l'ipercolesterolemia familiare, reclutati dal centro clinico che collabora alla ricerca.

A tale scopo, saranno investigati gli effetti della rosuvastatina:

- sull'accumulo di trigliceride e colesterolo indotto da Hz-LDL e da LDL di controllo (CtLDL);
- sul ruolo dei recettori scavengers nella interazione della cellula con le Hz-LDL e le CtLDL;
- sul ruolo di meccanismi LDL-recettore indipendente nell'*uptake* di LDL nei macrofagi.
- sulle interazione macrofagi-endotelio, mediante la valutazione di molecole di adesione;
- sulla secrezione dei mediatori di risposta infiammatoria.

Tale studio, di rilevante importanza clinica sarà realizzato mediante una collaborazione con La Unità Operativa di Plasmaferesi, della Università "La Sapienza" di Roma.

I risultati permetteranno di acquisire dati sugli effetti pleiotrofici della rosuvastatina e valutare se tali effetti sono relazionati o indipendenti dagli eventuali effetti sull'accumulo lipidico.

Trasferibilità dei risultati

Le ricadute sono di tipo scientifico e di tipo pratico soprattutto per la controparte clinica del progetto. Infatti, le conoscenze più accurate degli eventuali effetti pleiotropici della rosuvastatina, permetteranno di fornire indicazioni sull'utilizzo di tali terapie in maniera più accurata nei diversi stadi della malattia cardiovascolare.

Studio biochimico e molecolare di alterazioni del metabolismo lipidico e lipoproteico causa di patologie genetico-degenerative

1) Geni quali, APOE, APOB, LDLR, ABCA1, LPL e LCAT sono implicati nelle dislipidemie e loro sequele, attraverso anomale interazioni fra membrane cellulari e lipoproteine plasmatiche. Manca, però, la caratterizzazione delle mutazioni di rilievo patologico nella popolazione italiana e il ruolo svolto da alcuni comuni polimorfismi. È quindi utile proseguire la caratterizzazione di varianti geniche nazionali, per le evidenti implicazioni diagnostiche e terapeutiche, e condurre studi funzionali per chiarire il ruolo di fattori modulatori del fenotipo di patologie monogeniche. 2) A maggior ragione si ritiene utile approfondire il ruolo di altri geni finora poco considerati nel contesto di queste patologie quali, ad esempio, i geni di recettori nucleari orfani (LXR, FXR, PPAR, RXR), di recettori e trasportatori di membrana (SRB1, *ATP-binding cassette transporters*, LRP), di enzimi proteolitici e lipolitici che potrebbero rivelarsi efficaci modulatori del fenotipo e *target* di terapie. In questi casi si effettueranno studi di correlazione genotipo-fenotipo in nuclei familiari affetti e eventualmente si procederà a valutazioni funzionali *in vitro* come specificato di seguito. 3) Si appronteranno modelli sperimentali per valutare *in vitro*, con vari tipi cellulari (epatociti, fibroblasti, enterociti, macrofagi), e in condizione d'inibizione o di stimolazione di determinati geni, l'efflusso di lipidi cellulari verso le lipoproteine o, viceversa, la captazione cellulare di lipidi lipoproteici. Ciò permetterà d'approfondire il ruolo dei geni sulle interazioni membrane-lipoproteine, in particolare dei microdomini più coinvolti negli scambi lipidici.

Risultati attesi nel triennio

1) Sviluppo di una metodica di studio *in vitro* con diversi tipi cellulari del ruolo di mutazioni in specifici geni sulle interazioni tra lipoproteine plasmatiche e lipidi di membrana e sui livelli di espressione di geni notoriamente coinvolti nel metabolismo lipidico e lipoproteico.

2) Messa a punto delle metodiche per l'isolamento e lo studio analitico e funzionale dei microdomini di membrana maggiormente coinvolti nelle interazioni tra la membrana e i compartimenti intra- e extracellulari.

3) Utilizzazione del modello e delle metodiche di cui ai punti precedenti per valutare il ruolo fisiopatologico di vari geni coinvolti nel metabolismo lipidico e lipoproteico

4) Identificazione di geni coinvolti nella determinazione e modulazione di dislipidemie, calcolosi colesterolica e Alzheimer familiare attraverso studi di correlazione genotipo-fenotipo e valutazione *in vitro* dell'effetto di modificazione del prodotto genico sulle interazioni cellula-lipoproteina.

5) Identificazione di *markers* biochimici e molecolari prognostici dell'esito di trapianto ortotopico del fegato umano.

6) Caratterizzazione nei geni sopra menzionati di mutazioni e polimorfismi di rilievo patologico nella popolazione italiana.

Trasferibilità dei risultati

I protocolli cellulari e molecolari sviluppati nel corso dello studio saranno pubblicati e condivisi con i centri clinici che partecipano alle ricerche. Risulteranno, perciò, immediatamente suscettibili di trasferimento a centri diagnostici e clinici in ambito lipidologico, gastroenterologico e epatologico.

I dati genetico-molecolari prodotti nel corso dello studio entreranno a far parte di basi di dati nazionali e internazionali accessibili on-line.

Studio dei meccanismi di traduzione del segnale nella differenziazione megacariocitaria

Progenitori CD34+, purificati da sangue periferico umano, vengono indotti a differenziare selettivamente lungo la linea megacariocitaria. Parallelamente mediante l'aggiunta di inibitori specifici è inibita l'attivazione di componenti dei *pathways* Shc/Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR in risposta alla TPO. A partire dal giorno iniziale della coltura e nei giorni successivi, della differenziazione megacariocitaria fino alla formazione di piastrine, sono valutati, il grado di maturazione dei Mk, il numero dei lobi nucleari, la poliploidia nonché l'attivazione o meno di MAPK, AKT e mTOR. I nostri risultati indicano che l'inibizione dell'attività di ERK o mTOR induce un effetto opposto sulla ploidizzazione dei MK suggerendo che la modulazione di questi *pathways* è necessaria per la poliploidizzazione.

Ci proponiamo quindi di:

- studiare i *pathways* di traduzione attivati da TPO nel differenziamento megacariocitario mediante tecniche di trasduzione genica per overesprimere geni attivati e/o mediante RNA interference (RNAi) per rendere geni silenti.
- valutare l'effetto degli inibitori delle chinasi sull'espressione di proteine linea specifiche (es. glicoproteina Iba). Lo scopo è quello di dimostrare una eventuale associazione tra la modulazione della ploidia megacariocitaria e il livello di espressione delle proteine in oggetto
- studiare le differenze, a livello molecolare, degli effetti di TPO (fattore di crescita megacariocitario) e SDF-1 (chemochina il cui ruolo sulla poliploidizzazione è stato da noi recentemente dimostrato) sulla megacariocitopoiesi.
- valutare l'effetto degli inibitori delle chinasi sul ciclo cellulare e in particolare sull'espressione degli inibitori p21 e p27 delle CDK.
- studiare il meccanismo attraverso il quale SDF-1 induce le cellule megacariocitarie alla secrezione di VEGF.

Risultati attesi nel triennio

Negli anni successivi proseguiamo lo studio dell'effetto dell'attivazione dei componenti dei *pathways* Shc/Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR in risposta alla TPO sulla proliferazione/differenziazione megacariocitaria. In particolare, poiché i nostri studi hanno mostrato che la modulazione dell'attivazione dei *pathways* in oggetto è necessaria per una poliploidizzazione ottimale dei MK, si cercherà di individuare i meccanismi che ne sono alla base. Proseguiamo quindi con lo studio del meccanismo responsabile dell'induzione della sintesi di VEGF da parte di SDF-1 nei MK. Estenderemo quindi, gli studi *in vitro* sopra menzionati, ai progenitori CD34+ purificati dal sangue di cordone ombelicale per paragonare nei due sistemi gli effetti dell'attivazione delle MAPK.

Studio della regolazione della ferroportina e del TfR2 e della loro possibile implicazione nelle patologie del metabolismo del ferro

Verranno eseguiti i seguenti studi: a) analisi dell'espressione dei trascritti alternativi della ferroportina nelle cellule eritroidi di pazienti affetti da diverse forme di emocromatosi ereditaria; b) analisi del DNA dei pazienti per la presenza di mutazioni nella regione non codificante in 5'e/o nel promotore; c) caratterizzazione delle due isoforme p615 e p645 della ferroportina da noi individuate mediante generazione di anticorpi specifici; d) analisi della localizzazione sub-cellulare della ferroportina mediante tecniche di immunofluorescenza e microscopia confocale; e) studio 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; f) nell'ambito dello studio della regolazione traduzionale verrà verificato l'effettivo ruolo regolativo dei microRNA 93, 20 e 130, per i quali la ferroportina è stata identificata come gene bersaglio potenziale. Parallelamente nell'ipotesi di un "regolatore eritroide" separato da un "regolatore nel fegato" quale sensore dei livelli di ferro nell'organismo, inizierà uno studio sulla regolazione della ferroportina da parte dell'epcidina nelle cellule eritroidi e negli epatociti usando come modelli sperimentali le K562 e le HepG2. Poiché dati recenti indicano che il TfR2, prevalentemente espresso nel fegato, possa essere implicato nella regolazione dell'espressione della epcidina da parte del ferro, verrà analizzata la sua espressione allo scopo di chiarire eventuali relazioni tra ferroportina, epcidina e TfR2. Interessante sarà l'analisi dei casi di emocromatosi con mutazioni nel gene del TfR2.

Risultati attesi nel triennio

Comprensione della funzione della ferroportina nelle cellule eritroidi; espressione differenziale dei trascritti alternativi della ferroportina durante il differenziamento eritroide dei progenitori emopoietici isolati dai pazienti affetti da emocromatosi ereditaria rispetto a quelli provenienti da individui sani; diversa funzione e localizzazione sub-cellulare delle diverse isoforme della ferroportina; 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; comprensione delle reciproche relazioni tra ferroportina, epcidina e TfR2 nelle cellule eritroidi e epatiche.

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

Ci sono delle evidenze sperimentali che nella Fibrosi Cistica (FC) ci sia un'associazione tra il difetto genetico e l'alterato metabolismo degli acidi grassi insaturi. 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'alterata regolazione della risposta infiammatoria.

Nella CF si riscontra, inoltre, una carenza e uno squilibrio di acidi grassi essenziali, che sono strettamente correlati con la risposta infiammatoria delle cellule. Le alterazioni più frequenti riguardano gli acidi grassi poliinsaturi, in particolare si evidenzia una diminuzione dell'acido

linoleico (LA: 18:2) e dell'acido decosaesaenoico (DHA: 22:6). Attualmente si ritiene che questi *deficit* sono indipendenti dallo stato nutrizionale e dall'insufficienza pancreatica.

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. Tuttavia, nella FC il *deficit* di denaturasi, in grado di trasformare EPA in DHA, pone per questa patologia una forte indicazione terapeutica per una integrazione alimentare con preparazioni arricchite di solo DHA.

Risultati attesi nel triennio

Tuttavia, allo stato attuale le conoscenze sulle relazioni tra metabolismo degli acidi grassi polinsaturi, e in particolare del solo DHA e risposta infiammatoria nella FC sono limitate, per cui vi è necessità di studi controllati che si propongano di stimare l'effetto del DHA sui processi infiammatori allo scopo di proporre schemi di supplementazioni farmacologiche/dietetiche adeguate.

In collaborazione con il centro di Riferimento del Lazio per lo studio della fibrosi cistica, si intende collaborare per valutare l'effetto del DHA sul quadro infiammatorio in pazienti FC.

In particolare, si vorranno valutare gli effetti della integrazione alimentare con DHA sulla cascata metabolica dell'acido arachidonico, la risposta immuno-infiammatoria sistemica e dei neutrofili nella fibrosi cistica. Inoltre, si intende studiare se tali variazioni siano correlate con il 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 interrompere/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, permetterà, infatti, un utilizzo immediato delle conoscenze acquisite nella pratica clinica del centro clinico stesso.

Studio delle proprietà biofisiche delle membrane cellulari in pazienti affetti da insufficienza renale cronica

L'insufficienza renale cronica (IRC) è una patologia progressiva che si accompagna all'insorgenza e promuove l'evoluzione di numerose patologie secondarie a carico del sistema cardiovascolare, immunitario e osseo. La progressiva perdita della funzione renale comporta l'accumulo nel sangue di un insieme eterogeneo di sostanze indicate come tossine uremiche, a tutt'oggi non del tutto note in termini sia qualitativi sia quantitativi. La condizione uremica (stadio terminale dell'IRC) è caratterizzata inoltre da alterazioni del profilo lipidico e da modificazioni nella composizione delle membrane cellulari. Tossine uremiche da un lato e variazioni della composizione lipidica dall'altro possono modificare sensibilmente le proprietà biofisiche delle membrane cellulari - in particolare della membrana plasmatica - e incidere così in maniera significativa sulla funzionalità cellulare in termini di alterazioni della plasticità, della permeabilità di membrana, delle modalità di trasduzione del segnale e dell'esposizione di siti antigenici e recettoriali. A loro volta, tali tipi di alterazioni funzionali svolgono un ruolo decisivo nello sviluppo di patologie secondarie correlate all'IRC.

Obiettivi del presente studio sono i) caratterizzare le proprietà biofisiche delle membrane di cellule circolanti isolate da pazienti nefropatici e verificare se esse differiscano significativamente da quelle di cellule di controllo isolate da soggetti con normale funzione renale, ii) valutare in pazienti nefropatici eventuali correlazioni tra i parametri oggetto di studio e incidenza/gravità di specifiche patologie correlate all'IRC.

Risultati attesi nel triennio

Saranno valutati il potenziale di membrana, i flussi ionici trans-membrana, la fluidità e la polarità delle membrane cellulari nonché la tipologia, la quantità e la distribuzione di microdomini di differente fluidità nella membrana plasmatica di differenti tipi cellulari isolati dal sangue di i) pazienti uremici sottoposti a differenti trattamenti dialitici, ii) pazienti nefropatici a diversi stadi di evoluzione di IRC e non ancora sottoposti a trattamento dialitico, iii) soggetti sani di controllo.

Sulle cellule di controllo sarà inoltre valutato l'effetto sui parametri oggetto dello studio del trattamento *in vitro* con differenti concentrazioni di tossine uremiche a basso e medio peso molecolare isolate dal plasma dei pazienti uremici.

Trasferibilità dei risultati

Sulla base di quanto sopra esposto, la caratterizzazione delle proprietà biofisiche delle membrane cellulari e di come tali proprietà siano alterate nella condizione di IRC e dalla terapia dialitica si configura come uno strumento particolarmente promettente nello studio della patogenesi delle malattie correlate all'IRC e nell'individuazione di marcatori da utilizzarsi in ambito di prevenzione e terapia.

Studio e caratterizzazione del ruolo funzionale dei fattori di trascrizione e dei microRNAs nell'ematopoiesi e nelle leucemie umane

Recentemente è stata identificata una classe di piccoli RNAs non codificanti, o microRNAs (miRNAs), coinvolta nella regolazione genica durante lo sviluppo e la differenziazione cellulare. I miRNAs si legano all'RNA messaggero dei geni bersaglio e ne bloccano la traduzione. L'analisi dell'espressione dei diversi miRNAs nelle cellule normali e leucemiche è importante sia per definire il ruolo fisiologico dei miRNAs che per l'identificazione dei loro geni bersaglio, potenziali *target* terapeutici. In un primo progetto ci proponiamo di analizzare il profilo d'espressione dei miRNAs in campioni prelevati da pazienti affetti da neoplasie ematologiche, come le leucemie acute mieloidi (AML) o linfoblastiche (ALL), di confrontarlo con i dati di espressione dei miRNAs nell'ematopoiesi normale e di identificare i putativi geni bersaglio di questi miRNAs.

In un secondo progetto ci proponiamo di proseguire lo studio del ruolo funzionale dei fattori di trascrizione sia nelle cellule staminali e/o progenitori ematopoietici normali, che nelle cellule di leucemie provenienti da pazienti affetti da AML o ALL. In particolare proseguiremo lo studio del fattore PLZF (o *promyelocytic zinc finger*) coinvolto nel controllo per l'auto-rinnovamento (*self-renewal*) delle cellule staminali che abbiamo recentemente identificato come un repressore della molecola di adesione VLA-4 (*Very Late Antigen 4*) fondamentale per la mobilitazione delle cellule ematopoietiche e marcatore di prognosi negativa per le AMLs.

Risultati attesi nel triennio

Il primo studio ci consentirà, attraverso i dati di espressione dei miRNAs nelle leucemie AMLs e ALLs caratterizzate da anomalie cromosomiche note, di individuare un gruppo di miRNAs di interesse che confrontato con i dati di espressione dei miRNAs nell'ematopoiesi normale risultano "deregolati" nelle leucemie e di caratterizzare i loro geni bersaglio.

Nel secondo studio, definiremo i meccanismi molecolari attraverso i quali i fattori di trascrizione, in particolare PLZF, svolgono la loro attività biologica sia in condizioni fisiologiche che patologiche (leucemia) per ottenere informazioni sui loro potenziali geni bersaglio.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione e la caratterizzazione dei geni bersaglio, sia dei fattori di trascrizione che dei miRNAs, potrebbe consentire di disegnare strategie terapeutiche nella patologia delle leucemie.

La verifica della validità dei nostri risultati potrà essere effettuata secondo criteri e indicatori precisi come l'*impact factor* della rivista in cui verranno pubblicati i dati, il confronto con la letteratura scientifica nazionale e internazionale.

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 *remnants* dei chilomicroni

Oltre alla ricerca sulle LDL, anche lo studio dei *remnants* 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 cardiovascolari (CAD). È ormai chiaro che molti degli studi sul metabolismo lipoproteico a digiuno non rispecchiano il metabolismo umano, che si trova per circa i $\frac{3}{4}$ della propria vita in fase postprandiale. Nel triennio preceente abbiamo condotto degli studi che hanno chiaramente mostrato che i *remnants* dei chilomicroni interagiscono con le cellule vasali (endotelio, macrofagi e cellule muscolari) presenti nella lesione ateromasica. In particolare, si è dimostrato che l'interazione macrofago-*remnants* induce la formazione di *foam* mediante accumulo sia di trigliceride che di colesterolo, indipendente dall'ossidazione e dagli ossisteroli presenti nei *remnants* alimentari e dalla attività dei recettori *scavenger*, ma determinati da meccanismi di *uptake* lipidico diversi e parzialmente concomitanti e indipendenti. La interazione dei macrofagi con i *remnants* dei chilomicroni, inoltre, induce dei cambiamenti dello stato pro-infiammatorio/attivazione della cellula e della risposta metabolica. Quindi, il macrofago e la *foam cells* vanno considerate "isotipi cellulari" diversi, e investigate con approcci innovativi che tengano presente tali differenze. Inoltre, permane l'interesse sanitario, economico e sociale per capire il meccanismo cellulare e molecolare di prevenzione della CAD mediante supplementazione dietetica con micronutrienti, ai quali sono associati gli effetti benefici del consumo di frutta e verdura. Il fiorente mercato di tali prodotti testimonia in termini sanitari, economici e sociali, l'importanza di tali "micronurienti".

Risultati attesi nel triennio

Uno degli scopi principali degli studi è valutare l'ipotesi derivante dai nostri studi preceenti, su un diverso ruolo patogenico delle due componenti lipidiche principali dei *remnants* dei chilomicroni: trigliceridi e colesterolo. La valutazione di tale ipotesi innovativa, porterebbe un contributo cognitivo importante sul ruolo discusso e ambiguo giocato dai trigliceridi nello sviluppo dell'arteriosclerosi e delle malattie correlate.

Con i diversi disegni sperimentali, derivanti da approcci *ex-vivo* (ratti e topi transgenici), cellulari (cellule vasali primarie, nonché linee cellulari epatiche), molecolari (*gene silencing*) si intende:

1. Valutare l'ipotesi che i diversi lipidi presenti nelle lipoproteine postprandiali rappresentano dei fattori di rischio diversi per lo sviluppo delle *foam cells*.

1a. Decifrare i meccanismi di *uptake* delle diverse componenti lipidiche delle lipoproteine postprandiali.

1b. Ricercare strategie possibili per interferire con i processi descritti, nel caso che le ipotesi 1. e 1a. vengano confermate.

2. Valutare nel macrofago il grado di reversibilità dell'accumulo indotto da chilomicroni remnants e, se sì, quale componente lipidica è oggetto di tale reversibilità.

3. Valutare gli effetti di di micronutrienti lipidici (commerciali e/o proposti per uso umano) sui processi di formazione delle *foam cells*.

4. Associare allo studio degli eventi metabolici riportati nei punti precedenti le variazioni indotte da questi cambiamenti nello stato infiammatorio e di attivazione del macrofago e/o della *foam cells*.

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 *remnants* 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 CAD attribuibile ai trigliceridi.

Sviluppo di modelli terapeutici anti-HIV a livello delle cellule staminali e progeneritrici

Proponiamo di sviluppare modelli terapeutici anti-HIV *in vitro* su CSE/CPE purificate sia da sangue periferico che da sangue di cordone ombelicale utilizzando la frazione CD34+/KDR+ isolata e caratterizzata nel nostro laboratorio. Intendiamo trasdurre queste cellule con un vettore lentivirale che esprime la proteina mutata Nef capace di bloccare l'assemblaggio/rilascio di virioni. L'efficacia antivirale di questo vettore verrà saggiata sulla progenie ematopoietica derivata dalle CSE KDR+ trasdotte.

Intendiamo inoltre studiare gli effetti dell'infezione da HIV sulla differenziazione dendritica di progenitori CD34+, di precursori monocitari da essi derivati e di Mo maturi circolanti. A tal fine risulta evidente l'importanza di studi preliminari che intendiamo condurre sulla caratterizzazione delle DC ottenute *in vitro*. Nel nostro laboratorio sono stati messi a punto due sistemi differenziativi che consentono di ottenere colture altamente arricchite di DC da progenitori CD34+, direttamente o attraverso un precursore monocitario intermedio. Le popolazioni cellulari ottenute con i diversi sistemi di coltura saranno dettagliatamente analizzate dal punto di vista morfologico, fenotipico e funzionale soprattutto in relazione ai loro diversi stadi differenziativi/maturativi. I risultati ottenuti saranno confrontati con quelli relativi alle DC isolate da sangue periferico. Dati preliminari relativi all'infezione di progenitori CD34+ e di Mo maturi suggeriscono che l'HIV non altera significativamente l'aspetto fenotipico delle DC da essi derivate, mentre ne riduce sensibilmente la funzione di APC qualora vengano utilizzati ceppi di virus mono-citotropici. Intendiamo approfondire questi studi valutando se l'infezione modifichi altre funzioni quali, l'attività migratoria e la capacità di internalizzare l'antigene. Successivamente intendiamo analizzare gli effetti di HIV sulla differenziazione dendritica di precursori monocitari. Cellule CD34+ verranno indirizzate verso la serie monocitaria, infettate ai diversi stadi differenziativi con ceppi linfo- e mono-citotropici e quindi indotte verso la serie dendritica in presenza di GM-CSF e IL-4. Saranno analizzate le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle popolazioni ottenute utilizzando questo modello cellulare, in particolare verrà valutata l'attività replicativa dell'HIV, la capacità di internalizzare l'antigene, l'attività migratoria e la capacità di attivare linfociti T in saggi MLR.

Risultati attesi nel triennio

La frazione CD34+/KDR+ rappresenta la popolazione cellulare che ci proponiamo di utilizzare nella messa a punto di protocolli di trasduzione per lo sviluppo di modelli di terapia genica anti-HIV. L'effetto protettivo del vettore lentivirale sopra descritto verrà testato sui *lineage* ematopoietici suscettibili all'infezione da HIV, derivati dalla differenziazione selettiva delle CSE/CPE: monocitaria, megacariocitaria, dendritica e linfocitaria.

Studieremo anche l'effetto del virus sulla differenziazione dendritica di progenitori CD34+, Mo maturi e precursori monocitari. Poiché abbiamo osservato che la suscettibilità all'infezione e la capacità replicativa dell'HIV è notevolmente diversa nelle tre popolazioni in grado di originare DC, possiamo ipotizzare un diverso impatto del virus sui loro meccanismi differenziativi.

Valutazione degli effetti indotti da agenti di natura fisica e chimica su sistemi cellulari cresciuti con modalità bidimensionali e tridimensionali
Studio degli effetti delle radiazioni ionizzanti

Verranno analizzati gli effetti delle radiazioni ionizzanti di diverso LET (*Linear Energy Transfer*) e a diverse dosi sulla morte cellulare (necrosi, apoptosi e catastrofe mitotica) in linee cellulari tumorali di differente istotipo cresciute sia come *monolayer* che come sferoidi multicellulari. In particolare, verranno confrontate le diverse modalità di morte nei due modelli e il ruolo della proteina antiapoptotica survivina. Inoltre, verrà valutato il ruolo dell'ipossia e del *hypoxia inducible factor* (Hif-1) nella induzione della morte cellulare da radiazioni e nell'espressione di importanti molecole di adesione. Infine, verrà confrontata il rilascio di vescicole (exosomi) nei due modelli cellulari in risposta alle radiazioni. Queste vescicole possono rappresentare un meccanismo alternativo della trasduzione del segnale e, pertanto, possono essere coinvolte nella diversa risposta cellulare alle radiazioni nei due modelli.

Studio degli effetti di sostanze antineoplastiche

Verranno studiati gli effetti di varie sostanze antineoplastiche di sintesi e naturali sulla morte cellulare in linee tumorali cresciute in *monolayer* e come sferoidi. Anche in questo caso verrà studiata la diversa risposta nei due modelli a queste sostanze. Inoltre, verrà esaminata la differente espressione di importanti molecole di adesione conseguente al trattamento e alla modalità di crescita.

Risultati attesi nel triennio

Per quanto riguarda le radiazioni ionizzanti, si prevede di chiarire i meccanismi responsabili delle differenze nella modalità di morte nei due modelli cellulari (*monolayer* e sferoidi). In particolare, sarà studiato il ruolo della survivina in questi processi. Si prevede inoltre di chiarire come l'induzione di Hif-1 possa influenzare gli effetti delle radiazioni. Questo aspetto è particolarmente importante negli sferoidi che sono caratterizzati dalla presenza di gradienti di concentrazione di ossigeno. Inoltre, ci attendiamo di osservare differenze nell'espressione delle molecole di adesione in risposta a esposizione a radiazioni ionizzanti nei due modelli che presentano interazioni cellula-cellula molto diverse. Infine, si prevede di chiarire se le radiazioni ionizzanti possano provocare un differente rilascio di exosomi nei due modelli e se tali differenze possano essere coinvolti nel tipo di morte indotta.

Per quanto riguarda le sostanze antineoplastiche, ci si aspetta che le differenze nella modalità di crescita e nelle interazioni cellula-cellule di cellule cresciute in *monolayer* e come sferoidi possano essere responsabili di differenze nella risposta alle sostanze esaminate.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti con questi studi potrebbero portare a una migliore comprensione dei meccanismi alla base dei processi della morte cellulare indotta dalle radiazioni ionizzanti e da

sostanze antineoplastiche. L'utilizzo di colture tridimensionali di cellule tumorali, che presentano molte caratteristiche in comune con i tumori solidi *in vivo*, potrebbe indirizzare studi futuri a un sempre maggiore uso di questo modello più adatto. La maggiore comprensione dei meccanismi di azione delle radiazioni e dei farmaci negli sferoidi di cellule tumorali potrà portare a un miglioramento dei piani di trattamento sia radio che chemioterapici.

**Dipartimento
Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare**

Attività di controllo, valutazione, parere

Diagnosi di laboratorio di anemie emolitiche associate a difetti ereditari della membrana e degli enzimi eritrocitari

Gli accertamenti diagnostici sono richiesti frequentemente (150-200 /anno) da reparti clinici o laboratori ospedalieri che non dispongono delle necessarie competenze specialistiche nel settore. Le richieste hanno diverse motivazioni.: 1. Diagnosi per i pazienti con sintomatologia clinica caratteristica. 2. Accertamenti preventivi in previsione di interventi di trapianto di midollo osseo, fecondazione assistita o trattamenti farmacologici. 3. Studio di gruppi familiari con difetti genetici ereditari. Le ricerche diagnostiche effettuate nei nostri laboratori comprendono: 1. Esami ematologici di base (valori emocitometrici, morfologia eritrocitaria, fragilità osmotica). 2. Analisi elettroforetica qualitativa e quantitativa delle proteine di membrana; 3. Saggi di attività enzimatiche e intermedi metabolici eritrocitari; 4. Analisi del gene della glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Gli obiettivi diagnostici sono i seguenti: 1. Individuazione del *deficit* di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e identificazione della variante molecolare; 2. Individuazione di *deficit* di altri enzimi eritrocitari; 3. Individuazione di sferocitosi ed ellissocitosi ereditarie e caratterizzazione dei relativi profili biochimici.

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, altri centri ospedalieri e Autorità competenti.

Elaborazione di criteri per il controllo della qualità cellulare in banche per la conservazione di cellule staminali per uso clinico incluse le banche di sangue di cordone ombelicale

Il sangue contenuto nel cordone e nella placenta alla nascita è ricco di cellule staminali e di progenitori emopoietici. Per questa sua caratteristica, rappresenta una sorgente alternativa al midollo osseo molto promettente per il trapianto non solo di pazienti consanguinei ma anche e soprattutto di pazienti non consanguinei. In seguito al successo dei primi trapianti con sangue di midollo, sono state realizzate molte banche volte a conservare in condizioni ottimali il sangue di cordone per uso clinico. Inoltre, i recenti sviluppi scientifici sulla plasticità delle cellule staminali, hanno stimolato la creazione di “banche di cellule staminali ottenute da vari tessuti” per uso clinico. C’è quindi la necessità di censire le banche di cellule che si vanno via via creando e di elaborare dei criteri obiettivi, che in qualche caso deve comprendere lo sviluppo di reagenti appropriati, per il controllo di qualità delle cellule conservate nei vari stadi della loro manipolazione fino a quando non siano state iniettate nel paziente. Avendo collaborato strettamente all’organizzazione della prima banca di sangue di cordone realizzata nel mondo in qualità di responsabile del controllo di qualità delle cellule conservate, propongo di sviluppare, in collaborazione con il Centro Nazionale Trapianto, i seguenti obiettivi: 1) Preparazione di linee guida per il sistema di qualità delle banche cellulari per uso clinico, incluse le banche di sangue di cordone. 2) Sviluppo di reagenti nazionali per il controllo di qualità delle cellule staminali. 3) Registri delle banche di cellule staminali e di sangue di cordone per uso clinico.

Piano triennale

Sviluppare, in collaborazione con il Centro Nazionale Trapianto, i seguenti obiettivi:

Preparazione di linee guida per il sistema di qualità delle banche cellulari per uso clinico, incluse le banche di sangue di cordone.

Sviluppo di reagenti nazionali per il controllo di qualità delle cellule staminali.

Registri delle banche di cellule staminali e di sangue di cordone per uso clinico.

Valutazione delle nuove possibilità di diagnosi e trattamento delle malattie lisosomiali

Poiché le malattie lisosomiali si presentano con sintomi clinici molto variabili, l'unica possibilità di avere una diagnosi certa è basata sul dosaggio nei tessuti del probando dell'enzima il cui *deficit* è alla base della malattia. Per i saggi enzimatici si usano in genere leucociti o fibroblasti. Per diagnosi prenatali sono stati usati sia villi coriali che cellule di liquido amniotico. Lo studio degli enzimi lisosomiali in vari tessuti umani e la conoscenza delle loro proprietà ci ha permesso di ottimizzare le condizioni di dosaggio. La preparazione e l'uso dei substrati naturali marcati, che offrono un totale specificità del saggio è stata oggetto di varie nostre pubblicazioni nel passato. Da vari anni offriamo consulenza diagnostica a IRCCS e Centri Ospedalieri. La lunga esperienza ci rende quindi idonei a svolgere attività di controllo per diagnosi di malattie lisosomiali e per la valutazione dei relativi protocolli di saggi enzimatici. La diagnosi enzimatica è il passaggio indispensabile per iniziare la terapia delle malattie lisosomiali. Il trattamento enzimatico sostitutivo (*enzyme replacement therapy*, ERT) ha dato ottimi risultati. Recentemente è stato proposto un nuovo trattamento che è stato chiamato *substrate balance therapy* (SBS) e che tende a prevenire l'accumulo di sfingolipidi nei lisosomi riducendone la velocità di sintesi. In passato è stato da noi attivato un Registro Nazionale Gaucher con l'intento di valutare anche il *follow up* delle varie terapie. La nostra conoscenza delle malattie lisosomiali e la disponibilità dei dati del registro ci permetteranno di valutare l'efficacia dei nuovi trattamenti e i possibili effetti collaterali.

Piano triennale

Si prevee di svolgere attività di consulenza tecnico-scientifica secondo le richieste che perverranno dai centri ospedalieri, Istituti IRCCS e altre Autorità competenti.

Inoltre si proseguirà l'attività relativa al Registro Nazionale Gaucher con l'intento di valutare anche il *follow up* delle varie terapie.

**Dipartimento
Farmaco**

Attività di ricerca

Indagine su prodotti erboristici destinati a donne, sportivi e/o obesi

Il costante aumento dei prodotti naturali pubblicizzati come miracolosi per l'ottenimento di risultati che vanno dall'aumento della massa muscolare, del volume del seno o al dimagrimento, ha indirizzato i consumatori verso tali prodotti considerati erroneamente privi di effetti collaterali, sottovalutando che le sostanze implicate per il raggiungimento degli effetti sopra detti sono i fitormoni e le sostanze eferino-simili che possono interferire sul sistema ormonale e metabolico.

Con questo progetto s'intende prendere in considerazione alcuni prodotti in commercio destinati a queste tre categorie di persone. Si eseguirà lo *screening* delle piante in essi contenute per evidenziare, in confronto con gli *standard* di riferimento, i componenti con accertata attività ormonale o simile. Nei prodotti finiti, analizzati con metodi idonei, si ricercheranno i relativi fitormoni presenti nelle piante utilizzate per valutare se la quantità riscontrata corrisponde al valore naturale o se ne sia stato effettuato un arricchimento o un'aggiunta di sostanze di sintesi.

Per raggiungere tale scopo ci si avvarrà di tecniche sia separative, come cromatografia liquida preparativa, distribuzione in controcorrente, sia tecniche analitiche utilizzando metodiche cromatografiche quali TLC-SCAN, HPLC-DAD, GC-MS, GC-FID. Il fine ultimo della ricerca è quello di fornire indicazioni in merito alla sicurezza ed efficacia di tali formulati oramai presenti nel mercato erboristico in larga scala.

Risultati attesi nel triennio

I fitormoni naturalmente presenti nelle piante utilizzate nei prodotti in esame e ancor più quelli eventualmente aggiunti, possono interferire sul sistema ormonale e metabolico arrecando alterazioni all'equilibrio fisiologico.

La nostra ricerca è volta a evidenziare la pericolosità di tali preparati erboristici, sulla base della ben nota diffusione che stanno avendo; ad esempio nel campo femminile il desiderio dell'aumento del seno è attualmente una delle maggiori richieste estetiche.

Riguardo gli obesi e gli sportivi di entrambi i sessi, vengono pubblicizzati molti di tali prodotti, definiti spesso come "*eferina free*" e "*fat burner*" quando indicati per la definizione della massa muscolare a svantaggio della massa grassa. La loro assunzione non prende in considerazione gli eventuali rischi non ultimi quelli di un aumento dei valori della pressione arteriosa e in particolare nell'uomo quello dell'iperplasia prostatica. Nel caso poi di prodotti specificatamente dimagranti si può capire come l'aggiunta di sostanze con attività anfetamino-simili possa ulteriormente influire sul metabolismo.

Con questa ricerca si auspica di pervenire al raggiungimento di metodiche facilmente applicabili in grado di identificare e quantificare la presenza di fitormoni, sostanze eferino-simili naturalmente presenti e principi di sintesi eventualmente aggiunti nei prodotti erboristici coinvolti.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di metodiche chimico-analitiche per individuare la possibile presenza di fitormoni aggiunti o di ormoni di sintesi nei preparati erboristici sarà un supporto utile, trasferibile su grande scala, per la valutazione della sicurezza di tali prodotti, a salvaguardia della salute pubblica.

Lo scopo dell'elaborazione di queste metodiche è sia quello di verificare la rispondenza a quanto dichiarato sia di contribuire alla stesura di una auspicabile normativa nel campo dei prodotti erboristici, a tutt'oggi ancora carente, in contraddizione con la diffusione che questi preparati hanno anche attraverso reti commerciali facilmente accessibili e senza alcun controllo da parte di medici o specialisti del settore.

Ruolo delle alterazioni *redox* nei meccanismi di invecchiamento e degenerazione cellulare: studi *in vitro* ed *ex vivo* in pazienti con Broncopneumopatia Cronico Ostruttiva

La Broncopneumopatia Cronico Ostruttiva rappresenta la quinta causa di ospedalizzazione in Italia. È essenzialmente una patologia dell'anziano spesso caratterizzata da una significativa invalidità di cui si conoscono solo parzialmente la patogenesi e i *marker* prognostici di progressione. La BPCO è considerata una "malattia *redox*" in cui la presenza di specie reattive dell'ossigeno è determinante.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto, basato su dati da noi pubblicati negli ultimi anni, viene portato avanti in collaborazione con un gruppo di clinici dell'ospedale Forlanini di Roma e si propone di valutare in pazienti BPCO in vari stadi della malattia (in base a FEV1 ecc.) e in controlli *age-matche*: a) i parametri clinici generali prima e dopo terapia con farmaci antiossidanti (parametri reologici, funzionali ecc.); b) valutazione di parametri biologici (cellulari, per es. eritrociti) e plasmatici *redox* (LDL ossidate) prima e dopo terapia antiossidante e c) *markers* di progressione della malattia con possibilità di impiego clinico

Trasferibilità dei risultati

Individuazione determinanti di progressione nel sangue periferico

Identificazione e validazione di geni utili alla immunoterapia di tumori solidi tramite analisi del profilo di espressione genetica

Nel primo anno del progetto lo scopo di questa U.O. era di verificare *in vivo* le diversità nel comportamento di varie linee tumorali umane in relazione alla presenza di mutazioni di oncogeni. In particolare, sono stati disegnati esperimenti *in vivo* per verificare quanto la presenza di oncogeni mutati N-Ras o B-Raf potesse contribuire alla crescita *in vivo* e alla capacità metastatica del melanoma umano. Tali esperimenti sono stati condotti in topi SCID inoculati sottocute con 5 milioni di cellule di 655/2 una linea di melanoma da cui sono stati ottenuti cloni caratterizzati per la presenza N-Ras mutato al codone 61 o B-Raf mutato al codone 1796.

Sono in corso esperimenti *ex vivo* per comprendere le cause di questo maggior atteggiamento aggressivo dei cloni N-Ras+. Le cellule ottenute dai tumori cresciuti nei topi SCID sono state analizzate sia per overespressione di geni e/o proteine possibilmente legati all'atteggiamento metastatico, sia per comportamenti anomali che possano spiegare l'atteggiamento aggressivo *in vivo*. Si sta in particolare valutando l'ipotesi che i cloni particolarmente aggressivi siano in grado di crearsi un ambiente maggiormente acido se confrontati a quelli che crescevano meno *in vivo*. Nostri studi recenti hanno infatti mostrato che un trattamento antiacido dei tumori a base di inibitori delle pompe protoniche è in grado di sovvertire la resistenza dei tumori alle terapie citotossiche, nonché di interferire con alcune attività cellulari legate alla sopravvivenza dei tumori (Luciani et, 2004).

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nei topi mostrano che i cloni Ras+ sono più aggressivi, con un tasso di crescita del tumore sottocute che mediamente è doppio rispetto ai Ras-. La presenza di mutazioni Ras non sembra essere direttamente correlata con lo sviluppo di metastasi, riscontrate in 2/5 cloni testati. La presenza di metastasi è invece quasi sempre correlata con le maggiori dimensioni del tumore primario, sia nei cloni N-Ras+, sia nei cloni B-Raf+. Quindi, i cloni N-Ras+ causano metastasi indirettamente, essendo correlati ad una maggiore crescita tumorali. Le

metastasi sono state rilevate nei polmoni e/o nei linfonodi dopo 60 giorni dall'inoculo del tumore.

Ci si attende di capire meglio quale sia il portato *in vivo* della presenza della doppia mutazione Ras-Baf, sia in termini di crescita tumorale, sia in termini di neovascolarizzazione sia in termini di metastatizzazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio forniranno dati importanti sulla presenza di mutazioni genetiche da poter usare come *marker* di malignanza tumorale nel *follow up* di pazienti con melanoma.

Ruolo dei sistemi dei cannabinoidi e della nocicettina nel controllo della tolleranza

Sebbene gli analgesici oppioidi siano considerati i farmaci più potenti nella terapia del dolore, il dolore neurogeno risulta resistente alle terapie convenzionali o alle loro associazioni (oppiacei-antinfiammatori) e sensibile al trattamento con anticonvulsivanti (carbamazepina gabapentina). Un problema rilevante è costituito dall'evidenza che l'uso prolungato di oppioidi e anticonvulsivanti determina una progressiva perdita di efficacia o tolleranza, a cui si associa la dipendenza fisica e psichica. Questo incoraggia la ricerca pre-clinica all'identificazione di nuovi composti, privi di effetti indesiderati. L'agonista del recettore OP4 nocicettina e gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2 (anandamide, palmitoiletanolamide) inibiscono il rilascio di trasmettitori *in vitro* e mostrano attività analgesica e anticonvulsivante *in vivo*, suggerendo un ruolo dei sistemi cannabinergico e nocicettinergico nel controllo del dolore, dell'epilessia e della tolleranza/dipendenza. Il progetto si propone di: 1) verificare se la somministrazione cronica di nocicettina previene la tolleranza indotta da oppioidi, cannabinoidi e anticonvulsivanti in modelli sperimentali di dolore e di epilessia *in vivo*. 2) Chiarire i meccanismi che sottendono all'instaurarsi della tolleranza, determinando *in vitro* con tecniche immunochimiche, le eventuali alterazioni dei livelli di AMPc della sostanza P o CGRP in neuroni gangliari del midollo spinale.

Risultati attesi nel triennio

In studi recenti abbiamo evidenziato che la morfina produce tolleranza agli effetti antinocicettivi e sindromi epilettiformi nei roditori. Analogamente agli oppioidi, gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi determinano tolleranza analgesica. Il pretrattamento con nocicettina riduce l'analgesia, il rilascio di dopamina, noradrenalina e le sindromi epilettiformi indotti dalla morfina. In considerazione dell'azione inibitoria sul rilascio di trasmettitori e delle proprietà anti-oppioidi della nocicettina è prevedibile che il trattamento ripetuto con nocicettina possa bloccare la tolleranza/dipendenza e le convulsioni causate dagli oppiacei, così come la comparsa di tolleranza dei cannabinoidi o degli anticonvulsivanti. Inoltre la valutazione delle proprietà farmacologiche di nuovi ligandi dei recettori CB1 CB2 e OP4 potrebbe condurre all'identificazione di nuove molecole con proprietà analgesiche e antiepilettiche prive di effetti indesiderati.

Trasferibilità dei risultati

La recente identificazione di sistemi endogeni dei cannabinoidi e della nocicettina incoraggia studi di caratterizzazione farmacologica di nuove molecole con rapida insorgenza dell'effetto analgesico/antiepilettico, lunga durata d'azione, e ridotta quantità di effetti indesiderati, suggerendo lo sviluppo di alternative terapeutiche nel controllo del dolore, dell'epilessia o della tolleranza agli analgesici e agli antiepilettici.

An integrated approach to identify neurobiological and behavioral markers of onset and progression of Parkinson's disease

Parkinson's disease is characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. This pathological hallmark is associated with a number of symptoms including resting tremor, rigidity and bradykinesia. Also psychiatric symptoms, such as cognitive impairment and depression, co-occur with the core motor impairment in PD.

Animal models represent a valuable tool to investigate pathological mechanisms leading to PD nigrostriatal neurodegeneration, as well as to develop new venues for PD treatment. An appropriate animal model should meet a number of criteria such as replicability and reliability. The most commonly used PD model can be generated in the rat species by an unilateral injection, into the substantia nigra, of 6-hydroxydopamine (6-OH DA). This model meets several of the criteria mentioned above, but it is only useful to reproduce the most advanced phases of PD. Furthermore, since an unilateral lesion is produced, this model is not totally appropriate to study the subtle and/or complex motor, cognitive and emotional disturbances described in PD patients. An alternative model is generated in the rat species by injecting bilaterally 6-OH-DA into the dorsal striatum, thus causing a damage of the striatum restricted to the dorsal area and a partial lesion of substantia nigra that evolves gradually up to 16 weeks. This model mimics the early phases of PD, possibly allowing a detailed neurobiological and behavioral analysis of PD onset and progression. Furthermore, animal models of early phases of PD may help in identifying specific molecular pathways activated during the onset of the neurodegeneration progress, providing neurobiological and behavioral markers of the progression of the pathology and relevant information for the development of new therapeutic strategies.

Risultati attesi nel triennio

Full, detailed characterization of a rat model of the early phases of PD. A partial, bilateral and progressive degeneration of dopaminergic neurons in the striatum will be produced by a stereotaxic administration of 6-OH-DA (12 µg into the dorsal striatum of both sides) (OU Popoli, Dept. Drug Research and Evaluation, ISS). This model mimics the early phases of PD, thus, it is particularly suitable for the analysis and identification of early neurobiological and behavioral markers of the pathology as well as for the assessment of the efficacy of new early therapeutic strategies.

Exploitation of the techniques of chemical lesion of dopaminergic neurons by 6-OH-DA administration, set up in the rat species, in the mouse species in order to obtain a mouse model of early phases of PD (OU Popoli, Dept. Pharmacology). This will be particularly useful for the employment of the techniques of chemical lesion on genetically modified animals (e.g., transgenic mice over-expressing the alfa-synuclein gene). Furthermore, the advantages coming from the smaller size and consequent lower cost of maintenance of mouse comparing to rat species, and the resulting possibility to test more easily new therapeutics in a high number of individuals, may produce improvements of deliverables of national and international pharmaceutical companies.

The comparison among the rat models and the mouse model as concerns predictive and face validity and other features of the models will be an important added value of the project.

Basi molecolari del meccanismo d'azione dei farmaci nei recettori associati a G proteine

Oltre un migliaio di geni umani codificano per recettori di membrana associati a G proteine (GPCR; *alias*: recettori eptaelici o 7TMR). Queste molecole sono il bersaglio di circa il 40% dei farmaci "salvavita" attualmente in uso e figurano ai primi posti tra i *target* con alto potenziale di

drug discovery nella ricerca dei prossimi decenni. Decifrare il lessico molecolare che sottende il processo di attivazione di tale molecole è un elemento indispensabile per lo sviluppo razionale di nuovi farmaci.

Questo progetto ha tre principali obiettivi. a) Svelare la rete di interazioni intramolecolari che collegano il legame di un agonista con la conversione del recettore in forma attiva. b) Chiarire come tali interazioni determinino differenze di efficacia tra farmaci che competono per lo stesso recettore e delucidare la base molecolare della distinzione tra agonisti, antagonisti e agonisti inversi. c) Identificare il tipo di architettura sopramolecolare che organizza l'interazioni tra recettori e G proteina nella membrana cellulare e il ruolo che essa svolge nel meccanismo di attivazione e desensitizzazione dei farmaci.

Oggetto principale di tali studi sono le famiglie dei recettori adrenergici e oppioidi, che differiscono sia per il tipo di G proteine con cui interagiscono, che per la categoria di ligandi di cui trasmettono il segnale. Tali recettori hanno importanza in campi di notevole interesse sanitario, quali, le miocardiopatie, l'analgesia, la terapia delle tossicodipendenze.

Risultati attesi nel triennio

Si prevee di ottenere informazioni fondamentali sui principali determinanti strutturali e cellulari che sottendono l'efficacia dei farmaci. Ciò avverrà perseguendo tre principali linee sperimentali.

Utilizzando una stretta convergenza tra simulazioni di dinamica molecolare (Dr. Fanelli, Uni-Modena) ed esperimenti di sostituzione mediante mutagenesi con residui cisteinici per misurare l'accessibilità al solvente degli aminoacidi della sequenza recettoriale, si misureranno i principali tipi di movimento intramolecolare che si verificano nel recettore occupato da agonisti con diversa efficacia.

Attraverso l'impiego di cellule ingegnerizzate con recettori "costretti" a dimerizzare in complessi con lo stesso tipo di G proteina, valuteremo il ruolo delle interazione recettore-recettore nel meccanismo di azione degli agonisti inversi. Questi studi serviranno a chiarire l'ipotesi che l'agonista inverso agisca "sequestrando" la G proteina in forma inattiva. Tali conoscenze sono importanti per comprendere le strategie migliori per l'utilizzo terapeutico di tali composti.

Avvalendoci di una nuova tecnica (eBRET) di visualizzazione delle interazioni proteina-proteina in cellule viventi, recentemente messa a punto in laboratorio (vedi progetto Paola Molinari), condurremo studi di mutagenesi sito-diretta per identificare i residui che trasmettono perturbazioni conformazionali nel contatto tra recettore GPCR e G proteina.

Trasferibilità dei risultati

I grandi investimenti in tecnologie *high throughput* fatti dall'industria farmaceutica negli ultimi decenni non si sono tradotti né in un miglioramento della capacità d'immettere nuovi farmaci sul mercato, né in un'accelerazione del processo di *drug discovery*. È sempre più diffuso il convincimento che la ricerca farmacologica non possa essere indirizzata esclusivamente verso la generazione massiva di dati, ma che occorra anche approfondire le conoscenze sui meccanismi biologici e molecolari che sono alla base delle risposte farmacologiche.

Questo progetto si propone di ottenere informazioni fondamentali sulla chimica funzionale dei recettori GPCRs che siano globalmente applicabili a questa intera famiglia di proteine. Il gran numero di nuovi geni GPCR identificati dal progetto genoma confermano l'importanza che ha questo *target* per la messa a punto di nuove molecole con cui combattere malattie non ancora curabili o il cui trattamento sia ancora inadeguato.

Caratterizzazione della tossicità colinergica centrale e periferica indotta da xenobiotici (prodotti medicinali di sintesi e di origine vegetale, micotossine, pesticidi)

In questo studio si intende valutare, attraverso saggi *in vitro* e *in vivo* nel roditore, gli effetti di tipo anticolinesterasico indotti dall'esposizione a xenobiotici sia naturali sia di sintesi. I principali problemi di un'esposizione acuta e/o cronica a tali xenobiotici rivestono un ruolo differenziato a seconda della fase di sviluppo (fetale, neonatale, adulta e senile). Lo studio mira principalmente alla caratterizzazione dell'effetto anticolinesterasico con particolare riguardo al suo impatto a livello delle differenti forme molecolari dell'enzima la cui diversa localizzazione, all'interno o all'esterno della cellula, riflette un differente ruolo funzionale. Una diversa distribuzione delle suddette forme molecolari con una variazione del loro rapporto, è stata osservata infatti 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 potenziali molecole e analoghi strutturali responsabili di eventi avversi di natura colinergica sia acuti sia a lungo termine.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione degli aspetti tossicologici in relazione all'effetto di xenobiotici sull'attività delle differenti forme molecolari dell'acetilcolinesterasi.

Caratterizzazione *in vitro* e *in vivo* degli effetti anticolinesterasici indotti dall'esposizione a xenobiotici nelle varie fasi dello sviluppo.

Analisi delle cinetiche di inibizione enzimatica e dei meccanismi d'azione

Screening di sostanze di sintesi (farmaci e pesticidi) e naturali (metaboliti secondari estratti da piante e micotossine) a potenziale attività tossica anticolinesterasica.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni ottenute dagli studi *in vitro* e *in vivo* potranno fornire un utile supporto agli studi tossicologici di queste sostanze. In particolare, dagli studi di cinetica enzimatica, sarà possibile dedurre informazioni su nuove classi molecolari ottenendo nello stesso tempo utili indicazioni di carattere farmacologico.

Considerando la grande varietà e ubiquitarità degli xenobiotici in esame e il rinnovato interesse al 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).

Caratterizzazione funzionale di nuovi farmaci ad attività pro-apoptotica per il trattamento dei tumori refrattari alla chemioterapia convenzionale

La ridotta efficacia delle chemioterapie convenzionali nel trattamento dei tumori solidi può essere associata a elevati livelli di espressione della glutatione-S-trasferasi (GST). Gli GST sono una superfamiglia di enzimi coinvolti nei meccanismi di detossificazione cellulare che hanno un ruolo nella neutralizzazione ed eliminazione dei farmaci chemioterapici dalle cellule tumorali e capaci dunque di eliminare le capacità curative di una vasta gamma di farmaci. In particolare, la iperespressione dell'isoforma GSTP1-1 nella maggior parte dei tumori umani è stata considerata una delle principali cause dell'insorgenza della farmaco-resistenza. La elevata espressione di GSTP1-1 in cellule di osteosarcoma umano sembra essere associato al fallimento del trattamento chemioterapico preoperatorio. Dai dati di letteratura si evince quindi che una

strategia promettente per la cura degli osteosarcomi si basa sull'inibizione delle GSTP1-1. A tal fine verrà utilizzato un nuovo inibitore specifico della GSTP1-1, ideato e sintetizzato dal gruppo della Prof. Anna Maria Caccuri (Tor Vergata) con il quale sussiste un'attiva collaborazione. Questa molecola, denominata NBDHEX è un derivato del 7-Nitro-2,1,3-benzossadiazolo e ha già fornito risultati molto promettenti su linee tumorali leucemiche, di carcinoma epatico e polmonare.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione dei livelli di citotossicità del NBDHEX su cellule di osteosarcoma e analisi dell'eventuale capacità dell'NBDHEX di aumentare l'efficacia di chemioterapici usati tradizionalmente nella cura degli osteosarcomi. Obiettivo di questo studio è quello di diminuire le dosi utilizzate di chemioterapici correntemente utilizzati nel trattamento degli osteosarcomi e quindi di ridurre gli effetti collaterali che sono una delle cause principali della sospensione delle cure.

Altri obiettivi del progetto consistono nella i) caratterizzazione del meccanismo di morte cellulare indotto dal trattamento con l'NBDHEX mediante colorazione del nucleo e analisi con microscopio a fluorescenza; ii) determinazione dell'attività della caspasi 3 mediante spettrofluorimetria; iii) determinazione dell'attivazione (fosforilazione) e del ruolo svolto nel meccanismo di morte cellulare da alcuni enzimi della famiglia delle MAP-kinasi mediante *immunoblotting*; determinazione dello stato *redox* della cellula determinando il rapporto GSH/GSSG intracellulare mediante cromatografia su HPLC; iv) valutazione della attività di enzimi coinvolti nel metabolismo del GSH (glutazione S-trasferasi, glutazione reductasi, gamma-glutamyl transpeptidasi) mediante tecniche spettroscopiche; v) studio *in vivo* della cinetica di distribuzione dell'NBDHEX in vari tessuti animali sfruttando la fluorescenza intrinseca della molecola; vi) studi dell'efficacia dell'NBDHEX di inibire la crescita di osteosarcomi sensibili e resistenti trapiantati in animali di laboratorio. A tal fine verranno utilizzate tecniche istopatologiche.

Trasferibilità dei risultati

Utilizzo dello NBDHEX (derivato del 7-Nitro-2,1,3-benzossadiazolo) come farmaco ad attività pro-apoptotica per il trattamento dei tumori solidi e in particolare per quelli di origine muscoloscheletrica.

Chemoresistance. Melanoma (intrinsic resistance) and lung (acquired resistance). Proton pump inhibitors

This project represents an effort to develop concepts for treatment of tumors which are intrinsically resistant or have acquired resistance to conventional chemotherapy. We focus the work on questions related to pH changes in the extracellular compartment and in lysosomal compartments of tumor cells, bringing together three groups with expertise on proton pump inhibitors, drug screening and lysosomal cathepsins.

In definite *in vitro* models of human melanoma and adenocarcinoma cell lines experiments will be performed with the aim of establishing an as reproducible as possible response curve to PPI pre-treatment. To this purpose tumor cell lines will be treated with 5, 20, 50 or 70 mg/ml of omeprazol and after 1 or 2 days treated with various classes of anti-tumor drugs, including vinka alkaloids, MTX, 5-FU and cisplatin. In these culture the level of cytotoxicity will be measured, together with the ATP consuming and the intracellular (organelles) and extracellular pH. In a separate set of experiments the importance of environmental acidity in PPI activation and effectiveness will be also tested. To this purpose cell will be cultured in unbuffered medium or in media at established pH ranging from 5 to 7. In fact, preliminary experiments have shown that resistant tumor cells may live at pH 5. On the basis of these results a series of *in vivo*

experiments will be performed in the model of SCID mice transplanted with the human tumors. In these xenografts the in vivo pH of human tumors will be measured as compared to the normal surrounding mouse tissues, in mice treated or untreated with PPI, by using Nuclear Magnetic Resonance. The main of the project will be:

1. To identify the doses and duration of pre-treatment with proton pump inhibitors (PPI) to obtain the best effect in reversing both multidrug resistance and unresponsiveness of human tumors to anti-cancer drugs.
2. To investigate the mechanism/s underlying the effect of PPI on human tumor cells.
3. To set up diagnostic methodologies to measure acidity of human tumors in vivo.

Risultati attesi nel triennio

We hope to develop basic concepts concerning treatment of resistant tumor. Both theoretical knowledge as well as agents useful for therapy will be gained.

We hope that from these pre-clinical settings will come some important information on the treatment of resistant tumor patients. It is expected that a dose ranging in the PPI pre-treatment to obtain a better response to anti-tumor drugs will be obtained. Moreover, we want to provide to the clinicians as more as information on the PPI dependence from tumor acidity both in vitro and in vivo. Lastly, we want to develop NMR technologies allowing the in vivo measurements of tumor pH, in order to provide to the clinicians a new tool in the follow up of tumor patients.

We expect to be able to identify classes of agents that are useful for treatment of drug resistant tumors. This will be accomplished both by direct screening and by testing a class of agents with a lysosomal mode of action that are expected to show efficiency in drug resistant tumors. These agents will then be studied during future phases of the project. The expected results will be:

- 1: to obtain a reproducible dose response curve to PPI pre-treatment in in vitro systems (1-6 months).
- 2: to obtain information on the pKa needed to fully activate PPI in the tumor cell cultures (1-12 months).
- 3: to obtain reproducible results in assessing with NMR technologies the tumor pH in vivo in the model of SCID mice transplanted with the human tumors (1-18 months).
- 4: screening of NCI mechanistic set (879 compounds) on MCF-7/MCF-7ADR cell lines,

We expect to identify compounds that induce apoptosis on both cell lines (and, perhaps, preferentially in MCF-7ADR [if so, we will concentrate on these]).

- 5: screening of NCI mechanistic set on MCF-7 cells at neutral and acidic pH. We expect to identify compounds that induce apoptosis preferentially at acidic pH.

Trasferibilità dei risultati

The goal of this project is to provide to the clinicians a new in the treatment of tumor patients. Particularly, we want to show that the alkalization of the tumors through PPI pre-treatment will sensitize the tumors to cytotoxic therapies.

We want also to provide to the oncologists a new diagnostic tool consisting of NMR technology able to reliably measure the in vivo pH of human tumors before and after PPI treatment.

Determinazione di costituenti attivi in droghe vegetali dello stesso genere ma di specie diversa da quelle indicate in farmacopea

Obiettivo del progetto è determinare il profilo quali-quantitativo dei componenti attivi o caratteristici di alcune specie o varietà, oggi disponibili sul mercato, di droghe vegetali diverse da quelle dello stesso genere presenti in farmacopea (Ph.Eur.).

Le droghe che saranno sottoposte allo studio sono il biancospino (genere *Crataegus*), l'equiseto (genere *Equisetum*) e la salvia (genere *Salvia*).

Il biancospino, frutto di *Crataegus monogyna* e *C. laevigata* e fiori di *C. pentagyna*, *C. nigra* e *C. azarolus* secondo la Ph.Eur., è indicato per migliorare le funzioni coronariche e per i disturbi cardiovascolari in generale.

L'equiseto, parti aeree di *Equisetum arvense* (Ph.Eur. 01/2005:1825), utilizzato per il suo contenuto in flavonoidi e acido silicico come diuretico, cicatrizzante e coadiuvante nelle affezioni polmonari, può essere adulterato con altre specie e ibridi di questo genere, tossiche per la presenza di alcaloidi tipo nicotina e palustrina.

La salvia, *Salvia officinalis* foglie (Ph.Eur. 01/2005:1370), *S. triloba* o *S. fruticosa* foglie (Ph.Eur. 01/2005:1561) è raccomandata dalla Commissione e per le flogosi delle mucose orofaringee e per le dispepsie e come antiidrotica, grazie al suo contenuto in tannini, diterpeni amaroidi, triterpeni e monoterpeni volatili, come canfora e eucaliptolo. L'olio essenziale contiene però anche alfa e beta-tujone che hanno una certa attività convulsivante e perciò sono tossici.

Risultati attesi nel triennio

Per quanto riguarda il genere *Crataegus*, in commercio si ritrovano specie diverse dal *C. monogyna* di Ph.Eur. che sono più ricche in proantocianidine rispetto al contenuto minimo dell'1% richiesto dalla monografia. Verrà così presa in considerazione una di queste specie commerciali diverse, il *Crataegus laciniata*, particolarmente ricca in flavonoidi, e si cercherà di mettere a punto anche un metodo HPLC, alternativo al metodo spettrofotometrico riportato dalla Ph.Eur., per la determinazione degli oligomeri flavonoidici.

Per l'equiseto si pone il problema di definire un metodo di differenziazione della specie di Ph.Eur. da quelle adulteranti più certo rispetto all'esame macro e microscopico del materiale vegetale riportato in Ph.Eur. poiché i caratteri morfologici delle differenti varietà sono estremamente variabili. Saranno così presi in considerazione diversi lotti di campioni commerciali contro il campione di Ph.Eur. per analizzarli in accordo con la monografia Ph.Eur. e con metodiche più significative per identificazione, purezza e dosaggio, come la HPTLC con valutazione densitometrica delle sostanze flavonoidiche caratterizzanti la specie di Ph.Eur.

Per quanto riguarda la salvia, la Ph.Eur. limita il contenuto di tujoni allo 0,1% con valutazione su TLC. Ci si pone lo scopo di dosare per HPTLC-densitometria queste due sostanze su campioni commerciali. Inoltre si tenterà di assicurare l'identificazione delle specie di Ph.Eur. tramite un'identificazione molecolare con PCR.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto si propone di verificare la congruità dei profili quali-quantitativi dei componenti attivi o caratteristici delle specie in commercio delle piante officinali sopra descritte con le specifiche riportate nelle monografie relative della Ph.Eur. Altro scopo è quello di migliorare eventualmente i metodi di dosaggio riportati.

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 Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione Agraria, Monterotondo ("*Molecular identification of Panax ginseng C.A.Meyer in ginseng commercial products.*" J. of Ethnopharmacology, 2005, in press).

Il progetto è in linea con gli studi di sorveglianza sul mercato dettati dallo *European Directorate for the Quality of Medicines (EQM)* del Consiglio di Europa e anche con le *WHO guidelines on safety monitoring of Herbal medicines in pharmacovigilance systems*, 2004, per il controllo della qualità dei prodotti a base di erbe.

Effetti della memantina sulle alterazioni neuropatologiche e comportamentali in modelli animali di patologie neurodegenerative: la malattia di Huntington

Questo progetto si propone di valutare i possibili effetti neuroprotettiva della memantina in modelli sperimentali *in vivo* di corea di Huntington. Quanto è riportato in letteratura a proposito del possibile meccanismo d'azione della memantina (inibizione dell'eccessiva attivazione del recettore NMDA), lascia prevedere che questo farmaco possa rappresentare un valido approccio neuroprotettivo alla corea. Meccanismi eccitotossici, infatti, sembrano essere fortemente coinvolti nella patogenesi della malattia. Di particolare interesse sono le osservazioni che, in topi transgenici per la corea, si assiste sia a un'alterazione dei meccanismi di ricaptazione del glutammato da parte degli astrociti (il che si traduce in una disregolazione dei livelli extracellulari di questo neurotrasmettitore), sia a un'aumentata vulnerabilità agli effetti tossici dipendenti dalla stimolazione del recettore NMDA.

L'obiettivo principale dello studio è quello di studiare i possibili effetti della memantina nel prevenire o rallentare il processo neurodegenerativo responsabile della corea.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio consentirà di verificare se il trattamento con memantina esercita effetti neuroprotettivi in modelli sperimentali di corea di Huntington. Attraverso l'utilizzo di topi transgenici per la corea a diverse fasi della malattia (presintomatica, sintomatica precoce e conclamata), sarà possibile stabilire anche in quale momento del processo neurodegenerativo il trattamento con memantina sortisce i migliori effetti.

In una seconda fase dello studio si cercherà di chiarire se gli effetti neuroprotettivi della memantina sono limitati a modelli su base eccitotossica o sono evidenti anche in modelli basati sulla disfunzione mitocondriale. Questi studi saranno effettuati in due diversi modelli sperimentali (lesione striatale da acido chinolinico o da acido 3-nitropropionico) nei quali sono coinvolti meccanismi patogenici diversi.

Trasferibilità dei risultati

Trattandosi di un progetto di ricerca di base, è difficile prevedere la reale trasferibilità dei risultati. Qualora tuttavia il progetto dovesse dimostrare che la memantina è effettivamente in grado di contrastare/rallentare il processo neurodegenerativo in modelli sperimentali, questi risultati potrebbero porre le basi per il trattamento farmacologico di una malattia attualmente incurabile.

Effetto dell'alterazione del metabolismo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) sull'infiammazione della parete vascolare e sulle cellule circolanti del sangue periferico

Molti studi *in vitro* e *in vivo* hanno valutato il ruolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) nella modulazione del metabolismo del colesterolo e nella prevenzione delle malattie cardiovascolari. Evidenze sperimentali suggeriscono che le HDL esercitano diversi effetti sulle cellule della parete vascolare. Lo scopo di questo progetto è di valutare se la perturbazione del metabolismo delle HDL modula i livelli di espressione dei geni della parete vascolare e l'espressione di geni delle cellule periferiche, in particolare dei geni legati allo *stress* ossidativo e alla regolazione *redox* nel sangue periferico. Il progetto si articolerà in studi su sistemi animali, volti alla individuazione di geni modulati in animali con alterazioni del metabolismo delle HDL e in studi in sistemi umani, volti ad analizzare l'effetto dell'omocisteina e delle HDL sull'evoluzione della intima-media *thickness* (IMT) della carotide in pazienti con malattia coronarica. Verranno inoltre condotti studi *ex vivo* volti a stabilire l'effetto delle HDL sulla popolazione eritrocitaria e sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di soggetti sani.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto è finalizzato a definire:

- come la perturbazione del metabolismo delle HDL modula i livelli di espressione dei geni della parete vascolare e l'espressione di geni delle cellule del sangue periferico nei modelli animali;
- i marcatori coinvolti nella progressione della malattia vascolare;
- come l'omocisteina e le HDL modulano l'evoluzione della IMT della carotide in pazienti con malattia coronaria inclusa l'aterosclerosi.
- l'effetto dell'omocisteina e delle HDL sugli eritrociti e sui PBMC.
- il meccanismo coinvolto nella disregolazione delle funzioni immuni e della cascata apoptotica dei PBMC.

Trasferibilità dei risultati

La comparazione dei risultati degli studi condotti *in vivo* e *ex vivo* consentirà di monitorare la progressione della malattia vascolare e di comprendere i meccanismi attraverso i quali la perturbazione del metabolismo delle HDL esercita i suoi effetti sulle differenti popolazioni cellulari del sangue periferico.

Enantiomeri di sostanze chirali di interesse farmaceutico: separazione cromatografica analitica e semipreparativa, configurazione assoluta e attività biologica

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 (la chiralità) in campo farmacologico e biochimico. I problemi generati dalla stereoisomeria sono legati alla necessità di: a) isolare forme enantiomeriche con elevato grado di purezza enantiomerica; b) impiegare sofisticati metodi analitici stereoselettivi nello studio dei profili farmacocinetici e farmacodinamici dei singoli enantiomeri di un farmaco chirale; c) studiare la stabilità (o la labilità) configurazionale degli stereoisomeri, a causa di possibili fenomeni d'interconversione.

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 dei parametri farmacocinetici e farmacodinamici dei singoli enantiomeri) che a livello preparativo, come metodo alternativo alla sintesi stereospecifica o stereoselettiva, specie nelle fasi iniziali di sviluppo di nuovi farmaci chirali.

Risultati attesi nel triennio

Separazione cromatografica e caratterizzazione chimico-fisica, strutturale e biologica di enantiomeri di composti chirali di interesse farmaceutico.

Studio mirato delle interazioni dei ligandi chirali con i siti di legame della porzione recettoriale implicata nella risposta biologica e progettazione razionale di nuovi e selettivi ligandi.

Studio della stabilità configurazionale di composti chirali con unità stereogeniche labili.

Classi di composti chirali da studiare:

derivati azolici ad attività antimicotica;

derivati azolici inibitori selettivi delle forme A e B delle monoamminoossidasi (anti-MAO);

analoghi della Mianserina ad azione antidepressiva;

derivati pirazolici ad attività antiinfiammatoria (inibitori selettivi COX-2);
derivati DABOs con attività antiproliferativa e di citodifferenziazione su cellule di melanoma.

Trasferibilità dei risultati

I risultati scientifici saranno oggetto di pubblicazione e comunicazioni a congressi.

Farmaci contraffatti, un problema sanitario emergente: strategie per combattere la contraffazione dei medicinali

Il fenomeno della produzione e vendita di farmaci contraffatti ha assunto negli ultimi vent'anni proporzioni notevoli fino a rappresentare una grave minaccia per la salute pubblica. Secondo stime dell'OMS, il 10% dei medicinali venduti ogni anno nel mondo è contraffatto e il 45% dei farmaci contraffatti è rappresentato da antibiotici. Circa il 60% dei casi di contraffazione di medicinali riguarda i Paesi in via di sviluppo a causa della scarsità di regolamentazione e controllo sull'importazione, produzione e commercializzazione dei farmaci. Tuttavia, esso risulta in notevole aumento in Europa e nel Nord America. Secondo la *European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations* (EFPIA) anche l'Italia sarebbe coinvolta nella produzione dei medicinali contraffatti e nella loro importazione da paesi extracomunitari. Negli ultimi anni, inoltre, lo sviluppo dell'e-commerce, cioè la vendita diretta tramite Internet, ha creato un nuovo possibile canale di commercializzazione di farmaci contraffatti.

Risulta pertanto di primaria importanza poter disporre di metodi analitici rapidi, affidabili e versatili che possano essere eventualmente utilizzati dai laboratori preposti al controllo nello *screening* di medicinali potenzialmente contraffatti. Si ritiene altresì necessario definire un piano d'azione per favorire la cooperazione e la collaborazione in materia con organismi sia nazionali sia internazionali, in accordo con quanto indicato dall'OMS e dal CoE.

Risultati attesi nel triennio

Uno degli obiettivi indicati dall'OMS relativamente alle strategie in ambito farmaceutico per il triennio 2004-2007 è quello di favorire programmi mirati a combattere questo fenomeno emergente e in continuo aumento.

Il presente progetto si pone l'obiettivo di affrontare la problematica della contraffazione dei farmaci mediante una duplice strategia:

1. Sviluppo di metodi per l'identificazione e il dosaggio di principi attivi appartenenti ad alcune categorie di farmaci tra quelle più ampiamente utilizzate o per le quali sono stati già segnalati casi di contraffazione (antibiotici, cardiovascolari, antinfiammatori non steroidei, farmaci *lifestyle*, anabolizzanti. ecc.). Verranno sviluppati metodi di applicabilità generale prevenendo, ove possibile, un approccio multidisciplinare. Verranno utilizzate principalmente tecniche di cromatografia liquida (LC), gas cromatografia (GC), elettroforesi capillare (CE), cromatografia su strato sottile (TLC), spettroscopia (FT-IR, UV-vis e NMR) e termoanalisi (termomicroscopia, DSC e TGA). L'utilizzazione della tecnica di estrazione assistita a microonde (MAE) permetterà inoltre di effettuare l'estrazione del principio attivo dalla forma farmaceutica in tempi più brevi e con minore necessità di manipolazione del campione.

2. Creazione di un *expertise* a livello nazionale per la gestione di casi complessi legati alla contraffazione di medicinali e cooperazione in materia con organismi internazionali, in accordo con quanto indicato dall'OMS e dal CoE.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti costituiranno elementi utili per:

- fornire il necessario supporto tecnico agli interlocutori sanitari di laboratori preposti al controllo grazie allo sviluppo di metodi analitici rapidi, affidabili e versatili da utilizzarsi nello *screening* di farmaci potenzialmente contraffatti;
- monitorare e valutare il fenomeno della contraffazione farmaceutica in Italia e studiare idonee azioni di contrasto;
- rafforzare la cooperazione internazionale per lo scambio di informazioni inerenti il fenomeno della contraffazione farmaceutica.

Farmacologia dell'apprendimento e della memoria

Il potenziamento delle capacità cognitive rappresenta uno degli obiettivi primari della neuropsicofarmacologia. Sebbene lo studio dei meccanismi dell'apprendimento abbia compiuto notevoli passi avanti nelle ultime decadi, diversi aspetti dei processi mnesici rimangono avvolti da un sostanziale mistero. Il progresso delle conoscenze in questo campo è reso impellente dall'aumento della prevalenza delle demenze associate con l'allungamento della vita e il conseguente spostamento della piramide demografica verso le età più avanzate. Gli obiettivi della nostra ricerca includono a) l'approfondimento dei meccanismi che sottendono le alterazioni cognitive associate all'invecchiamento e alla somministrazione di determinate molecole; b) la sperimentazione di trattamenti (farmacologici, genici, con cellule staminali, con tossine batteriche) in grado di migliorare le prestazioni mnesiche e di ripristinare i meccanismi funzionali del punto precedente. Il progetto prevede l'impiego di modelli animali e lo studio delle loro prestazioni nei *test* comportamentali, nonché la caratterizzazione delle loro alterazioni neurobiologiche in studi *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Sono inoltre in programma ricerche nell'umano finalizzate allo studio a) dell'utilizzazione di farmaci nootropi nella popolazione; b) dell'efficacia clinica di trattamenti attivi nelle sindromi demenziali; c) di aspetti neurofisiologici e farmacologici della memoria.

Risultati attesi nel triennio

Il risultato principale del nostro lavoro dovrebbe consistere nella messa a punto di trattamenti di tipo sintomatico e patogenetico delle demenze. Gli scopi del progetto comprendono inoltre lo studio di meccanismi implicati del deterioramento cognitivo in modelli animali di malattia di Alzheimer e di ipertensione arteriosa.

Ci proponiamo poi di caratterizzare gli effetti amnesizzanti dei cannabinoidi (delta8- e delta9-tetraidrocannabinolo, anandamide, nabilone) e, quindi, di testare molecole di questa classe che sono supposte essere prive di questo effetto indesiderato.

Tra i risultati attesi includiamo la messa a punto tecnologie ottiche per l'analisi della risposta fisiologica del tessuto nervoso (in collaborazione con il L.E.N.S. di Sesto Fiorentino), quali la registrazione dell'attività elettrica, di misurazione dei flussi ionici e di studio della morfologia delle spine dendritiche mediante microscopia confocale *in vivo* e *in vitro*. È prevista l'applicazione ai problemi sperimentali di tecniche di rilascio di *cage compounds* mediante *flash UV*, della “*total internal reflection fluorescence microscopy*” (TIRFM), della “*fluorescence lifetime imaging*” (FLIM), della generazione ottica di seconda armonica (SHG).

Un altro risultato potrà essere rappresentato dalla descrizione delle pratiche di trattamento della demenza nella popolazione italiana, comprendente anche i trattamenti per i sintomi psicologici e comportamentali in corso della stessa (BPSD) con particolare riferimento all'impiego di neurolettici tipici e atipici. Cercheremo inoltre di individuare, mediante studi osservazionali, il potenziale effetto neuroprotettivo di trattamenti già disponibili.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di terapie in grado di facilitare la cognizione e di proteggere dal danno neuronale comporterebbe consistenti risparmi per i servizi sanitari e migliorerebbe sostanzialmente il livello del salute delle popolazioni anziane.

Un altro risultato potenzialmente trasferibile consisterebbe nella scoperta di cannabinoidi provvisti di limitati effetti amnesizzanti. Ciò faciliterebbe l'impiego terapeutico di questa classe di molecole. I risultati degli studi sull'uso dei farmaci nella popolazione permetteranno il miglioramento delle pratiche di prescrizione attraverso una serie di interventi formativi mirati.

Farmacologia per la salute della donna: studio dei meccanismi alla base dell'influenza del genere (*gender differences*) sulla reattività vascolare

È ormai ampiamente riconosciuto che le differenze biologiche esistenti fra genere maschile e femminile e, quindi, anche fra l'uomo e la donna, possono portare a una differenza nella reattività ai farmaci con effetti clinici potenzialmente diversi nei due sessi. Pertanto il fatto che l'uomo e la donna possano rispondere in maniera diversa alla somministrazione dei farmaci costituisce un forte stimolo per ricerche di base tendenti ad approfondire la natura dei meccanismi che sono all'origine di tali differenze. Inoltre, tali studi possono anche fornire indicazioni utili per la comprensione di quanto scaturito da numerosi dati clinici che hanno evidenziato la diversa incidenza di alcune patologie nei due sessi. In particolare è stata infatti dimostrato che l'incidenza di patologie vascolari è minore nelle giovani donne rispetto agli uomini di pari età e alle donne postmenopausa. Pertanto, poiché tale fenomeno è stato principalmente attribuito anche alla minore reattività vascolare del genere femminile rispetto a quello maschile, dovuta ad una maggiore produzione di un fattore "protettivo" rilasciato dall'endotelio femminile, il nitrossido (NO), obiettivo principale del progetto è di verificare, su segmenti vascolari *in vitro* provenienti da entrambi i sessi, la possibile differente produzione non solo di NO, ma anche degli altri fattori endoteliali contrattili e rilascianti, saggiandone l'influenza sulla reattività a stimoli fisiologici e a farmaci.

Risultati attesi nel triennio

Su segmenti arteriosi e venosi isolati in vitro provenienti da vari distretti circolatori prelevati da animali da laboratorio maschi e femmine o espuntati da vasi umani in corso di operazioni di *bypass* aorto coronarico saranno verificate le risposte funzionali indotte da vari neuromediatrici e autacoidi con attività endotelio-dipendente o da stimolazione dei nervi simpatici intramurali. Saranno quindi eseguite misure quantitative dell'NO e dei prostanoidei, in particolare il trombossano, prodotto in seguito a tali stimoli, verificando anche l'espressione degli enzimi essenziali per la loro sintesi (nitrossido sintetasi, cicloossigenasi).

Successivamente sarà valutata la correlazione fra le risposte funzionali e le variazioni della concentrazione di calcio intracellulare indotte da agonisti con attività endotelio dipendente, mediante la simultanea determinazione delle variazioni di tensione della muscolatura liscia vascolare e di concentrazione intracellulare dello ione.

Sarà infine verificato il possibile differente effetto sui vasi provenienti dai due sessi dei farmaci (calcio antagonisti, apertori dei canali del potassio, ecc.) che agiscono sulla concentrazione di calcio intracellulare o di prodotti che inibiscono la sintesi/effetti dei fattori endoteliali (antagonisti delle endoteline, inibitori della sintesi o antagonisti del trombossano, ecc).

Trasferibilità dei risultati

La comprensione di alcuni dei meccanismi alla base delle differenze biologiche fra il genere femminile e maschile può fornire un utile contributo sia in campo farmacologico che di salute pubblica. Infatti, la messa a punto di modelli preclinici in grado di evidenziare le possibili

differenze fra i due sessi può fornire indicazioni utili per le successive fasi cliniche nello sviluppo di un nuovo farmaco e indicare nel contempo la possibilità di strategie terapeutiche diverse nei due sessi.

Farmacovigilanza attiva sull'impiego dei trattamenti farmacologici per la terapia della sindrome da iperattività con *deficit* di attenzione nel bambino e nell'adolescente

La sindrome da iperattività/*deficit* di attenzione (ADHD) è uno dei più comuni disordini neuropsichici dell'età evolutiva. La diagnosi è clinica.

La prevalenza oscilla tra il 4% e il 12% (USA, UK, Francia). In Italia, studi condotti in ambiti locali danno prevalenze da 0,43% a 3,6%. La prevalenza nella popolazione pediatrica italiana complessiva è ignota.

Gli approcci terapeutici sono farmacologico e psicodinamico. Per le forme clinicamente meno gravi la terapia psico-comportamentale (*parent training, child training*) dà risultati soddisfacenti. Le forme più gravi devono essere trattate con farmaci specifici. Vengono utilizzati: antidepressivi triciclici, agonisti alfa-2 adrenergici, bloccanti selettivi del *reuptake* della noradrenalina, psicostimolanti (metilfenidato, amfetamine). Gli inibitori del *re-uptake* delle monoamine sono i farmaci più efficaci per l'ADHD. Sono in grado di migliorare l'inibizione delle risposte, la memoria di lavoro e i processi di discriminazione degli stimoli. L'atomoxetina (*norepinephrine reuptake inhibitor*) ha efficacia simile agli psicostimolanti. I migliori risultati terapeutici si ottengono con la combinazione della terapia farmacologica e psico-comportamentale.

I più comuni effetti collaterali sono diminuzione di appetito, insonnia e irritazione gastrointestinale. Effetti sull'accrescimento staturale-ponderale sono stati segnalati nei trattamenti prolungati. Gli psicostimolanti possono anche indurre o peggiorare movimenti involontari, tic e idee ossessive. Possono indurre variazioni rapide del tono dell'umore con aumento o diminuzione dell'eloquio, ansia, eccessiva euforia, irritabilità, tristezza (disforia). Dosi elevate possono indurre, paradossalmente, sedazione e diminuzione delle capacità di apprendimento. Alcuni farmaci presentano minore tollerabilità (desipramina: effetti anticolinergici e rischio di cardiotoxicità), assuefazione (clonidina). L'atomoxetina, può causare epatotossicità di media o alta gravità e ideazione suicidaria.

Tra gli effetti indesiderati dei farmaci disponibili per l'ADHD l'interferenza sui meccanismi di crescita è quello meno conosciuto.

Risultati attesi nel triennio

Definizione di un appropriato percorso diagnostico-terapeutico con diffusione e implementazione delle relative linee guida.

Integrazione tra servizi/competenze: questo modello assistenziale potrà, successivamente, essere esteso ad altre patologie neuropsichiatriche (es. depressione) nell'ambito della promozione della salute mentale del bambino e dell'adolescente. In particolare il progetto si prefigge:

- La definizione del profilo beneficio/rischio ottimale: miglior rapporto posologia/risposta clinica/eventi avversi, valutando la tollerabilità e sicurezza dei farmaci ad azione sul *reuptake* delle monoamine (dopamina, noradrenalina) utilizzati nella terapia della Sindrome da iperattività con *deficit* di attenzione (ADHD o DDAI) nella popolazione di età compresa tra 7 e 18 anni.
- La stima della prevalenza della sindrome nella popolazione italiana in età evolutiva;
- La validazione dei *test* diagnostici e valutazione dell'accuratezza della diagnosi;
- La descrizione dei profili prescrittivi;

- La valutazione dell'incidenza e gravità degli effetti collaterali, in particolare l'impatto sui processi di accrescimento somatico del bambino;
- La stima del tasso di soggetti con ADHD in terapia farmacologica rispetto al totale dei soggetti diagnosticati.

Trasferibilità dei risultati

Definizione di un appropriato percorso diagnostico-terapeutico con diffusione e implementazione delle relative linee guida.

Integrazione tra servizi/competenze: questo modello assistenziale potrà, successivamente, essere esteso ad altre patologie neuropsichiatriche (es. depressione) nell'ambito della promozione della salute mentale del bambino e dell'adolescente.

Gli inibitori dell'integrasi di HIV. Studi clinici e biologici

L'integrasi dell'HIV costituisce un *target* molto promettente per la terapia antiretrovirale, essendo un enzima cruciale per la replicazione del virus e la sua persistenza nelle cellule infettate. Attualmente varie molecole di inibitori dell'integrasi (I.I.) sono in fasi diverse di sperimentazione clinica, ma nessuna è ancora stata approvata per la commercializzazione. La nostra attività in questo campo si articolerà come segue:

1) proseguimento dell'attività di coordinamento di una ricerca di fase II, multicentrica e multinazionale, con l'MK 0518, un I.I. della Merck Sharp & Dohme. La popolazione di pazienti in studio è composta da soggetti con infezione da HIV multiresistente agli antiretrovirali attualmente disponibili.

2) partecipazione a una ricerca di fase III, multicentrica e multinazionale, con l'MK 0518, come membri dello *steering committee* e coordinatori di un sottostudio sui meccanismi di resistenza *in vivo* e sulla persistenza virale (livelli di replicazione residua e HIV DNA) in corso di trattamento. La popolazione in studio avrà caratteristiche sovrapponibili a quelle dei pazienti inclusi nella fase II.

3) studio di nuove molecole anti-integrasi di tipo mono- o bifunzionale (che agiscono cioè solo sulla fase dello *strand transfer* o anche su quella del "3' processing") e delle loro proprietà *in vitro*: inibizione della replicazione di HIV in linee cellulari infettate, effetti sulla p-glicoproteina e sulle altre pompe cellulari responsabili di *multidrug resistance*, induzione di apoptosi.

Risultati attesi nel triennio

1) definire l'efficacia (in termini di attività antiretrovirale e di ricostituzione immunologica) e la tollerabilità del farmaco MK 0518.

2) Approfondire i meccanismi di azione *in vivo* dell'MK 0518 e, in particolare, l'induzione di resistenze geno-fenotipiche e gli effetti sulla persistenza di HIV in una popolazione di pazienti pesantemente pretrattati con altri antiretrovirali e limitate opzioni terapeutiche.

3) Individuare alcune caratteristiche funzionali degli I.I. potenzialmente utilizzabili per disegnare nuove molecole e per ipotizzarne impieghi clinici in patologie diverse dall'infezione da HIV.

Trasferibilità dei risultati

Nell'insieme, i dati emersi dagli studi sugli I.I. dell'HIV contribuiranno ad aumentare le opzioni terapeutiche per le persone con HIV. In particolare, i risultati delle ricerche cliniche di fase II e III potranno essere utilizzati per l'autorizzazione all'immissione in commercio dell'MK 0518.

Lo studio delle interazioni con la p-glicoproteina e le altre pompe di membrana potrà aprire nuove prospettive di impiego di questi farmaci come, ad esempio, la loro somministrazione insieme ad agenti chemioterapici allo scopo di aumentarne l'attività antitumorale.

Glial-mediated modulation of striatal dopaminergic neurotransmission: role of adenosine and metabotropic glutamate receptors

Dopamine is a key neurotransmitter in the striatum, and striatal dysfunctions have been classically ascribed to a primary, if not exclusive, dysfunction of the dopaminergic system. Although such a view is basically still valid, in the last few years increasing importance has been ascribed to the modulatory role of other neurotransmitter systems on the dopaminergic transmission. The glutamatergic and the adenosinergic systems, in particular, are now being regarded as interesting targets for treating “dopaminergic” diseases. Glutamate acts by activating both ionotropic and metabotropic receptors, while adenosine activates A1, A2A, A2B and A3 receptors. Among the above receptors, adenosine A2A receptors (A2ARs) and subtype 5 of group I metabotropic glutamate receptors (mGlu5R) are the most abundantly expressed in the striatum, where they contribute to the regulation of motor activity, synaptic plasticity and excitotoxic processes. Stimulation of striatal A2ARs induces dopamine and glutamate release, although the mechanism responsible for such an effect remains to be determined. A recent study by Nishizaki et al. (2002) suggests that glial cells are involved in the effects of A2A receptors in the modulation of glutamate levels. Interestingly, both A2A and mGlu5Rs are expressed by glial cells and could thus be involved in the above mechanism. Moreover, activation of striatal mGlu5Rs induced an increase in glutamate outflow quite similar, both in magnitude and in shape, to that induced by A2AR agonists.

The aim of the present project is to verify the hypothesis that striatal dopaminergic neurotransmission could be modulated by means of a glial adenosine-glutamate interaction.

Risultati attesi nel triennio

The study will contribute to the understanding of the following points: i) whether A2AR antagonists are able to counteract the increase in striatal glutamate induced by glial glutamate blockers; ii) whether A2AR agonists are able to stimulate dopamine release in the ventral striatum (nucleus accumbens) and whether the effects of A2A receptor stimulation are influenced by drugs acting on glutamate receptors; iii) whether mGlu5Rs, alone or after costimulation of A2ARs, influence glial glutamate release; iv) whether the functional interaction existing between A2A and mGlu5Rs is influenced by dopaminergic denervation.

The experimental methods will involve several techniques (striatal microdialysis, stereotaxic surgery, electrophysiology in corticostriatal slices) that are routinely used by the two research groups. Animal care and use will follow the current European and U.S.A. guidelines.

Trasferibilità dei risultati

The results will contribute to the current understanding of the role of glial cells in the modulation of glutamate homeostasis.

I microbici come nuova strategia terapeutica per l'inibizione della trasmissione per via mucosale di HIV-1 nel modello animale hu-SCID

L'area di ricerca nella quale si sta lavorando si propone di testare l'attività pre-clinica *in vivo* di sostanze ad attività antiretrovirale specifica e non, somministrate per via mucosale in forma di gel, come microbici capaci di inibire l'infezione per via mucosale da HIV-1. Il modello animale SCID ricostituito con linfociti umani (hu-SCID) verrà da noi utilizzato per valutare e testare l'azione locale dei microbici ad attività antiretrovirale. Topi CB.17 SCID/SCID (femmine di 4-5 settimane di vita) vengono sincronizzati per via sottocutanea con progesterone e ricostituiti per via intraperitoneale con 4×10^7 PBMC umani. Dopo 7 giorni dalla ricostituzione i topi saranno pre-trattati per via vaginale con il microbici da testare e successivamente inoculati (20 minuti dopo il trattamento) sempre per via vaginale con 2×10^6 PBMC infettati *in vitro* con due differenti ceppi di virus R5 e R5X4 di HIV-1 (SF162 e 1/BX08).

La capacità o meno da parte del pre-trattamento con microbicida, di inibire l'infezione da HIV-1 sarà valutata a livello sistemico mediante:

- analisi al FACS e conta delle cellule T CD4+ vs CD8+ in cellule peritoneali;
- dosaggio dei livelli di p24 su sovrantante di coltura di cellule peritoneali (co-culture e *test* ELISA);
- analisi quantitativa di *gag* in PCR su DNA estratto da cellule isolate da milza e linfonodi.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi del progetto consistono in:

- identificare in primo luogo le combinazioni migliori di eccipiente/farmaco. In tal riguardo bisogna mettere in evidenza che sia il farmaco da testare che l'eccipiente non dovranno essere tossici a livello locale né tantomeno alterare le condizioni di pH e di flora batterica locale. Per questo motivo sarà necessario individuare per ciascun composto le concentrazioni ottimali da utilizzare mediante cinetica con dosi scalari. Questo avverrà dapprima per ogni singola molecola e successivamente verificando gli effetti dei frammi/eccipienti differentemente combinati.
- mettere a punto la metodica quantitativa Real-Time-PCR per la rilevazione della presenza del virus HIV-1 sotto forma di DNA provirale integrato nelle cellule umane estratte da tessuti murini.

Un limite del modello hu-SCID, dovuto alla citoarchitettura della parete vaginale, è quello di non poter riprodurre l'infezione da HIV per via vaginale utilizzando virus libero, ma solo virus cellulo-associato. Pertanto di non poter utilizzare questo modello per testare l'efficacia pre-clinica *in vivo* di microbicidi in grado di inibire la trasmissione mucosale di HIV come virus libero.

A tale proposito un ulteriore obiettivo consisterà nell'utilizzare il modello animale SCID per la riproduzione di infezione da HIV-1 per via rettale sia con virus libero che con virus cellulo-associato utilizzando diversi ceppi di virus R5 e R5X4 di HIV-1 (i.e. SF162 e 1/BX08).

Il modello SCID di infezione per via rettale ci consentirà di testare i microbicidi a nostra disposizione sia per la possibile capacità di inibire la trasmissione per via mucosale da HIV come virus libero che come virus cellulo-associato.

Trasferibilità dei risultati

Utilizzando il modello animale SCID di infezione da HIV-1 per via vaginale da noi messo a punto, ci proponiamo di confrontare l'attività di diverse molecole (i.e. NNRTI, CADA, lectine HHA, PRO2000, inibitori del legame con il DC-SIGN, peptidomimetici del ligando CD4), con l'obiettivo di poter realizzare una combinazione di tali sostanze da utilizzare in somministrazione unica per uso topico.

Immunoterapia di malattie infettive e trasmissibili mediante anticorpi monoclonali umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv)

Gli anticorpi monoclonali in forma scFv per le caratteristiche strutturali e funzionali che li contraddistinguono e che includono i) alte rese con costi notevolmente ridotti in virtù dei processi di produzione che avvengono utilizzando fermentazione batterica ii) origine umana che elimina molte delle reazioni avverse degli anticorpi murini di origine somatica, iii) procedure di isolamento e selezione che vengono effettuate rigorosamente *in vitro* rendendo indipendente l'ottenimento degli scFv dall'immunogenicità e tossicità dell'antigene, rendono questo tipo di anticorpi particolarmente adatti per la immunoprofilassi di malattie infettive. I tempi di realizzazione estremamente brevi per isolare e produrre scFv specifici (generalmente tre-quattro settimane), consentono la loro utilizzazione in trattamenti di prima linea in caso di pandemie (in attesa dello sviluppo di vaccini). Obiettivo di questo progetto è quello di isolare anticorpi

monoclonali capace di combattere i processi infettivi del tetano e della SARS mentre le potenzialità applicative degli anticorpi diretti verso varianti patogene della proteina prionica (PrP) dovranno essere valutati attraverso la verifica dei cambiamenti conformazionali indotti nella PrP a seguito del legame antigene-anticorpo. Utilizzando la stessa strategia metodologica (*biopanning* della libreria anticorpale sull'antigene proteico espresso per via ricombinante) verranno sviluppati anticorpi contro quelle glicoproteine di H5N1 che come la Emagglutinina (HA) e la Neuraminidasi (NA) hanno dimostrato la loro capacità protettiva inducendo una elevata ed efficace risposta umorale. Questi anticorpi benché non utilizzabili a priori per combattere l'influenza aviaria pandemica (intraspecie) possono risultare utili in forme infettive interspecie. Questo studio servirà per mettere a punto tutte quelle procedure e metodologie che potrebbero rivelarsi utili per un eventuale rapido sviluppo di anticorpi monoclonali umano diretti verso ceppi mutanti di H5N1

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si articola intorno allo sviluppo di diverse classi e tipologie di anticorpi monoclonali che includono:

scFv diretti verso il tossoide tetanico comprendenti forme maturate per affinità mediante mutazioni sito-dirette. Gli anticorpi in forma scFv verranno saggiati *in vivo* per le loro capacità di proteggere l'animale dagli esiti letali dell'infezione. A questo scopo potranno essere sviluppati mediante tecniche di DNA ricombinante immunoglobuline intere che associano alla competenza delle scFv le capacità effettrici di definite Fc.

scFv diretti verso la proteina del nucleocapside (N) della SARS. Questi anticorpi saranno sviluppati utilizzando le stesse metodiche di biopanning descritte per le altre selezioni di scFv ma avranno caratteristiche funzionali diverse. Infatti verranno prodotti da librerie anticorpali fagiche capaci di generare scFv esprimibili a livello intracellulare.

scFv diretti verso la forma ricombinante della PrP di *hamster* cinese. Questi anticorpi benché teoria non capaci di riconoscere in modo selettivo la variante patologica della PrP possono trovare ugualmente una utilizzazione applicativa alterando e/o bloccando i cambiamenti conformazionali associati al fenomeno trasmissibilità.

scFv diretti verso le glicoproteine HA e NA di H5N1. Questi anticorpi se mostreranno un qualche livello di protezione significativo in infezioni interspecie verranno maturati per affinità ed eventualmente espressi, mediante opportune manipolazioni geniche, come immunoglobuline complete di Fc.

Trasferibilità dei risultati

Le varie tipologie di anticorpi monoclonali in forma di scFv diretti verso antigeni che caratterizzano strutturalmente e/o funzionalmente patologie infettive o trasmissibili costituiscono dei reagenti genico-molecolari di base per sviluppare composti biologici da utilizzare in terapie immunoprofilattiche.

Influenza del genere sulle alterazioni della funzionalità endoteliale coinvolte nella patogenesi della vasculopatia diabetica

L'incidenza delle malattie cardiovascolari nelle donne in premenopausa è minore rispetto agli uomini di pari età, tuttavia questo "vantaggio" scompare nelle donne diabetiche che presentano una prognosi peggiore dell'uomo soprattutto per quanto riguarda le complicanze vascolari. La compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente fin dagli stadi preclinici della malattia costituisce l'alterazione principale della vasculopatia diabetica; l'esatto meccanismo con cui essa si instaura non è chiarito. In modelli animali si è visto che essa è legata a un elevato *stress* ossidativo con incremento della produzione diretta di ROS che neutralizzano l'attività vasodilatatrice di NO. Lo stesso ruolo "protettivo" di NO è oggetto di

discussione in quanto grandi quantità di NO, sintetizzate mediante induzione della iNOS in cellule stimulate con citochine infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , INF- γ), possono causare effetti citotossici, anche se con meccanismi non ben chiariti. Oltre al NO l'endotelio produce anche EHF, che è attivo soprattutto nei vasi di resistenza e che *report* sempre più numerosi indicano presentare un dimorfismo sessuale: uno sbilanciamento della sua liberazione in seguito a fenomeni infiammatori o *stress* ossidativo, potrebbe essere responsabile della maggiore facilità con cui le donne sviluppano la vasculopatia diabetica rispetto agli uomini.

Questo studio si baserà quindi sull'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.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio verrà condotto su segmenti arteriosi e venosi isolati *in vitro* provenienti da vari distretti circolatori di conigli maschi e femmine. In primo luogo saranno compiute esperienze di controllo per evidenziare e caratterizzare le differenze di genere per quanto riguarda gli effetti funzionali e la produzione dei fattori endoteliali in seguito alla attivazione della NOS costitutiva e dopo induzione di iNOS mediante incubazione con citochine o LPS. Gli esperimenti verranno condotti in parallelo su vasi incubati con un medium normoglicemico o contenente eccesso di glucosio per valutare gli effetti dell'iperglicemia nei due sessi e sui vari fattori. Gli effetti del diabete conclamato verranno studiati su vasi provenienti da animali resi diabetici mediante allossana. Contemporaneamente gli stessi parametri verranno valutati anche su vasi umani (vena safena, arteria mammaria o radiale) prelevati da soggetti di entrambi i sessi, diabetici e non, in corso di espianti per *bypass* aortocoronarico.

Saranno verificate le risposte funzionali indotte da vari neuromediatori e autacoidi con attività endotelio-dipendente o da stimolazione dei nervi simpatici intramurali. Saranno quindi eseguite misure quantitative dell'NO e dei prostanoidei, in particolare il trombossano, prodotto in seguito a tali stimoli, verificando anche l'espressione degli enzimi essenziali per la loro sintesi (nitrossido sintetasi costitutiva e inducibile, cicloossigenasi).

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

Eventuale messa a punto di modelli preclinici da utilizzare in farmacologia previsionale

Inibitori delle tirosin kinasi e proliferazione cellulare

Lo sviluppo di agenti farmacologici innovativi capaci di inibire la proliferazione cellulare è stata particolarmente focalizzata 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

La finalità di questo progetto è quella 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 tra recettori A2A e mGlu5 nello striato: ruolo funzionale e possibile approccio alternativo al trattamento del morbo di Parkinson

L'obiettivo generale del progetto è quello di ricercare nuovi approcci terapeutici al morbo di Parkinson. In particolare, sulla base di risultati ottenuti in precedenza dal nostro gruppo, intendiamo verificare l'ipotesi che l'interazione funzionale tra recettori A2A dell'adenosina e mglu5 del glutammato possa rappresentare un *target* per lo sviluppo di nuove terapie.

Obiettivi specifici di questo progetto sono i seguenti: i) verificare se antagonisti selettivi dei recettori mGlu5 sono in grado, da soli e in combinazione con antagonisti A2A, di esercitare effetti anti-ipocinetici in modelli sperimentali di morbo di Parkinson; ii) valutare se la deafferentazione dopaminergica altera l'interazione funzionale A2A/mGlu5; iii) verificare se l'espressione e/o la funzionalità dei recettori mGlu5 sono alterate nel cervello di topi *knock-out* per i recettori

Risultati attesi nel triennio

Verifica dell'attività antiparkinson degli antagonisti mGlu5 in diversi modelli sperimentali di morbo di Parkinson.

Valutazione degli effetti della deafferentazione dopaminergica sull'interazione funzionale A2A/mGlu5. questi studi consentiranno di stabilire se l'interazione tra questi due recettori venga in qualche modo alterata in condizioni patologiche simili a quelle che si verificano nel morbo di Parkinson. Tale informazione è essenziale per poter pensare allo sviluppo di terapie antiparkinson basate sull'interazione A2A/mGlu5 a livello striatale.

Valutazione di possibili alterazioni dell'espressione e/o della funzionalità dei recettori mGlu5 nel cervello di topi geneticamente deprivati dei recettori A2A. Questi studi potranno confermare l'esistenza e chiarire l'importanza del ruolo permissivo esercitato dai recettori A2A sugli mGlu5.

Trasferibilità dei risultati

La potenza e la selettività dell'interazione funzionale tra recettori A2A e mGlu5 lasciano supporre che tale interazione possa essere sfruttata per il trattamento del morbo di Parkinson. Questo studio consentirà innanzitutto di chiarire se la suddetta interazione è in qualche modo alterata in modelli sperimentali di morbo di Parkinson e di verificare l'ipotesi che antagonisti A2A e mGlu5 possano avere un effetto antiparkinson di tipo sinergico.

Invecchiamento e neurodegenerazione: effetti delle alterazioni dei lipidi di membrana nella neurotrasmissione

I *rafts* lipidici sono costituiti da zone della membrana composte da sfingolipidi e colesterolo, nelle quali 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 al NMDA (N-metil-D-

aspartato), coinvolto nei meccanismi alla base di molte malattie neurodegenerative. Risultati preliminari indicano che questo effetto è rilevabile anche in fettine di cervello di roditore, e che la riduzione di colesterolo nei *rafts* induce una inibizione della plasticità sinaptica, meccanismo alla base della memoria. Si utilizzeranno modelli animali, per analizzare l'effetto di alterazioni strutturali dei *rafts* sulle risposte cellulari ai neurotrasmettitori eccitatori e inibitori, studiando la localizzazione e la composizione dei *rafts* di membrana nelle cellule nervose e le eventuali modificazioni dei parametri elettrofisiologici. Verranno in particolare studiate le alterazioni a livello funzionale dei meccanismi recettoriali che utilizzano come neurotrasmettitore rispettivamente NMDA, AMPA, acido kainico e GABA. Il passo successivo sarà di valutare se la manipolazione farmacologica dei *rafts* di membrana possa migliorare le alterazioni di conduzione delle cellule nervose in modelli di malattie neurodegenerative quali ad esempio il morbo di Alzheimer, o in malattie dislipidemiche, quali il morbo di Niemann-Pick.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di identificare i meccanismi che sottendono alla comunicazione interneuronale, che vengono coinvolti nel disregolazione dei *rafts* 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 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 *paire pulse facilitation* e la *paire pulse inhibition*. I dati risultanti da questi studi forniranno informazioni sullo specifico coinvolgimento dei sistemi recettoriali, indicando se l'eventuale danno sia prevalentemente a carico del sistema eccitatorio o di quello inibitorio.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti attraverso questi studi potrebbero aprire il campo a nuove strategie farmacologiche terapeutiche sia nelle patologie neurodegenerative che in quelle dislipidemiche.

Isolamento e caratterizzazione di nuove tipologie di anticorpi monoclonali selezionati per le capacità di neutralizzazione dei processi infettivi di HIV-1

Sudi pregressi sulla risposta umorale indotta dall'infezione di HIV-1 indicano che la glicoproteina env svolge un ruolo di primo piano nella induzione della risposta umorale. Tuttavia, vaccini basati sulla somministrazione della sua subunità monomerica (gp 120) non hanno dato risultati soddisfacenti. Gli anticorpi generati sembrano prediligere e inibire forme virali atipiche non paragonabili ai ceppi che causano AIDS. Probabilmente la gp 120 non mima in modo adeguato la complessa struttura glicoproteica coinvolta nel processo infettivo che risulta composta da un trimero; pertanto gli anticorpi generati da un monomero di env non trovano un corrispondente ligando nei ceppi di HIV-1 che causano AIDS. Per contro una forma trimerica di env caratterizzata da una delezione di V2 (delezione) sviluppata, espressa e prodotta mediante tecniche di DNA ricombinante sulla base del gene R5-tropico di HIV ceppo SF162, ha dimostrato di essere capace in esperimenti condotti in primati di indurre una soddisfacente risposta umorale protettiva.

Un rapido esame dei pochi anticorpi fin qui isolati capaci di esercitare una azione anti HIV ha rivelato che essi mostrano un tratto comune: la parte variabile delle immunoglobulina sia come frammento di scFv o anticorpo dotato di Fc mostra mutazioni strutturali che consentono

alle varie forme anticorpali di legarsi in maniera più efficace alle glicoproteine di HIV-1 e di esercitare conseguentemente un'azione neutralizzante. Alla luce di questi dati ci siamo posti come obiettivo di sviluppare una serie di anticorpi monoclonali che utilizzando come antigene di base la proteina HIV O-GP 140 SF 162 DV2 (envd2) posseggano tutte quelle caratteristiche strutturali e funzionali adeguate ad un'azione neutralizzante.

Risultati attesi nel triennio

1a classe di anticorpi: *single chain fragment variable* (scFv) derivati da una libreria anticorpale sintetica umana (ETH-2) espressa su fagi M13 filamentosi. L'isolamento di questi anticorpi avviene *in vitro* mediante *biopanning* la libreria fagica sull'antigene designato (envd2). Cicli ripetuti di questa procedura selettiva portano all'identificazione di scFv specifici consistenti in VH e VL legate fra loro a formare una proteina immunocompetente di 27 kDa. Anticorpi scFv capaci di esercitare una significativa inibizione del processo infettivo possono essere manipolati geneticamente (mutati in specifici siti aminoacidici) e rifelezionati per maturazione di affinità.

2a classe di anticorpi: anticorpi monoclonali somatici derivati da fusioni cellulari fra linfociti di coniglio immunizzati con HIV O-GP 140 SF 162 ?V2 e mielomi murini (nuova tecnica) con il fine di ottenere cloni stabili di ibridomi topo/coniglio dai quali generare librerie anticorpali mediante tecniche di DNA ricombinante. Queste librerie fagiche verranno rifelezionate mediante *biopanning* sull'antigene designato. L'obiettivo è quello di ottenere scFv di coniglio che sono strutturalmente simili agli anticorpi anti HIV neutralizzanti.

3a classe di anticorpi: anticorpi monoclonali originati dal sistema immune dei camelidi (*nanobodies*). Per lo sviluppo di *nanobodies* utilizzeremo due strategie alternative e complementari. L'animale (Cammello o Lama) sarà sottoposto a immunizzazione con HIV O-GP 140 SF 162 DV2 e i linfociti verranno utilizzati per due distinti procedimenti sperimentali: nel primo verranno fusi con mielomi murini per isolare anticorpi monoclonali somatici e generare una volta identificato in clone ibrido stabile/positivo librerie fagiche anticorpali. Nel secondo procedimento i linfociti dell'animale saranno utilizzati come sorgente genetica per la costruzione di librerie anticorpali da selezionare mediante *biopanning* su envd2.

Trasferibilità dei risultati

Obiettivo di questa ricerca è quello di isolare anticorpi monoclonali di varia natura e specie che abbiano la capacità di neutralizzare l'infezione di HIV1 (in esperimenti condotti *in vitro* sulla linea TZMBL/CD4/CCR5/CXCR4). Per questo motivo verranno sviluppate forme atipiche di anticorpi (scFv umane e di coniglio, *nanobodies*/VHH umane e di altre specie), diretti verso HIV O-GP 140 SF 162 ?V2 che risultano strutturalmente e funzionalmente simili a quelli fin qui isolati e con capacità protettive.

ISSQoL-responsiveness: Studio osservazionale multicentrico per la verifica di responsività del questionario ISSQoL

Il questionario ISSQoL, costruito per valutare la qualità della vita delle persone con infezione da HIV nell'era HAART, è stato validato nel 2004. Le analisi psicometriche di attendibilità e di validità dell'ISSQoL hanno rappresentato un primo *step* nell'analisi dello strumento, a seguito del quale è prevista un'ulteriore verifica di validità: la responsività. Per responsività si intende la capacità di uno strumento di percepire un cambiamento delle condizioni di vita del paziente, in relazione al progredire della malattia e all'azione della terapia.

Risultati attesi nel triennio

La responsività del questionario ISSQoL sarà verificata attraverso uno studio osservazionale e longitudinale. Verranno raccolte le informazioni su un campione di circa 100 persone (in osservazione presso alcuni centri clinici nazionali di malattie infettive) aventi le seguenti

caratteristiche: a) pazienti che iniziano per la prima volta un trattamento b) pazienti che iniziano un differente regime terapeutico c) pazienti già in trattamento e che non subiscono nessun cambiamento nella terapia assegnata.

Trasferibilità dei risultati

I dati raccolti permetteranno una più accurata verifica di validità del questionario ISSQoL.

La caveola: un sub-compartmento cellulare elettivo per lo studio della formazione neoplastica e del metabolismo lipidico e un possibile bersaglio farmacologico

Le caveole sono microdomini lipidici molecolarmente organizzati all'interno di una formazione cava della plasma membrana (PM) da proteine strutturali, le caveoline e da alte concentrazioni di colesterolo e sfingolipidi che includono i gangliosidi. Le caveoline (Cav) presentano sequenze aminoacidiche con capacità interattiva e regolativa su un vasto numero di importanti proteine del segnale cellulare es.: Src chinasi, G-eterotrimeriche, H-Ras, PKC, e-NOS, chinasi PI 3, integrine, EGFR. Le Cav possiedono inoltre un'alta affinità associativa con importanti implicazioni metaboliche con il colesterolo e gli acidi grassi. L'unicità della composizione lipidica rende le caveole biofisicamente differenti e isolabili dal contesto cellulare. L'analisi biochimica delle caveole (dall'elettroforesi alla spettroscopia di massa) permette di decifrare l'associazione molecolare segnale presente in dati momenti fisiopatologici della cellula o del tessuto preso in esame. I topi geneticamente modificati per le caveoline costituiscono modelli sperimentali avanzati per lo studio di patologie quali: le cardiovascolari, oncologiche e del metabolismo lipidico.

Il nostro gruppo ha un retaggio pionieristico nella biologia cellulare delle caveole/caveoline avendole isolate, caratterizzate e ipotizzato per primi il loro ruolo fondamentale nel segnale cellulare. Disponiamo direttamente o indirettamente attraverso collaborazioni, di tutte le esperienze tecniche necessarie per studiare le problematiche sopra elencate.

Risultati attesi nel triennio

È tipica della crescita tumorale l'indipendenza dall'ancoraggio cellulare.

Le integrine che nelle cellule normali mediano la crescita dipendente all'adesione attraverso il controllo di *pathway* multipli di segnale lo perdono durante i processi metastatici. Le integrine inducono l'attivazione della c-Src chinasi che si associa e fosforila la Cav1. La formazione di tale complesso è localizzata nelle *focal adhesion*. Riteniamo che lo studio comparato di tale formazione in cellule normali e cellule di melanoma umano possa fornire una chiave interpretativa di associazione/dissociazione molecolare importante per comprendere l'indipendenza dall'ancoraggio cellulare e della migrazione nei modelli metastatici.

Altro aspetto importante riconducibile alla caveola/Cav-1 è quello legato alla capacità di assorbire gli acidi grassi e di trasportarli dalla PM ai Corpi Lipidici (CD) dove vengono immagazzinati come trigliceridi. Topi nulli per Cav-1 presentano un tessuto adiposo estremamente ridotto a causa dell'incapacità di formare CD. Scopo della nostra indagine sarà quella di identificare in cellule che esprimono o non Cav-1 il traffico vescicolare prodotto dall'aggiunta di acidi grassi attraverso una dissezione biochimica che possa individuare lo spostamento di Cav-1 dal compartimento caveolare a quello dei CD l'indagine è tesa ad individuare i cambiamenti nelle associazioni molecolari che coinvolgono Cav-1 in funzione dell'accumulo di trigliceridi nei Corpi Lipidici.

Trasferibilità dei risultati

La contemporaneità d'azione della cav-1 su : 1) recettori/*pathway* multipli del segnale di traduzione, 2) trasporto e regolazione del metabolismo lipidico (acidi grassi e colesterolo) fanno della caveola/caveolina un promettente bersaglio farmacologico "chemo-preventivo" sia sul

versante cardiovascolare che oncologico. Un'esemplificazione di questo viene dal tumore della prostata in cui la Cav-1 è stata identificata come un indicatore di alta malignità e un bersaglio terapeutico. Le cellule cancerose aumentano la sua espressione e agiscono in modo autocrino/paracrino per cui la Cav-1 è fortemente presente nel siero di pazienti con tumore alla prostata. Inoltre l'aumento di colesterolo collegato all'aumento di Cav-1 media la sopravvivenza del tumore. Farmaci quali le statine (simvastatina) usati nelle patologie cardiovascolari per abbassare il colesterolo interferiscono nella progressione del tumore prostatico attraverso l'inibizione del segnale anti apoptotico mediato da Akt

La Medicina Tradizionale afro-americana come fonte di piante medicinali per l'identificazione, caratterizzazione e valutazione bio-farmacologica di nuove sostanze naturali ad attività terapeutica

Il presente progetto trova fondamento sulla nuova Direttiva 2004/24/CE, emanata dal Parlamento europeo il 31 marzo 2004, che modifica le disposizioni comunitarie della 2001/83/CE in materia di immissione in commercio dei medicinali per uso umano per quanto attiene i medicinali vegetali tradizionali. Tale direttiva raccomanda che, per quanto attiene la sicurezza e la qualità del prodotto, questa debba essere valutata attraverso "prove chimico-fisiche, biologiche e microbiologiche". La presente ricerca si propone di studiare da un punto di vista fitochimico e poi bio-farmacologico quelle piante che vengono utilizzate nella Medicina Tradizionale africana e sudamericana. Gli estratti delle piante e loro parti, qui inviate da etnofarmacologi locali, opportunamente identificate dal punto di vista botanico, saranno progressivamente frazionati fino all'isolamento delle sostanze pure, che verranno caratterizzate dal punto di vista chimico-strutturale utilizzando metodi chimici e spettroscopici, in particolare di ^1H e ^{13}C NMR mono e bidimensionale, spettrometria di massa e dicroismo circolare. Le sostanze purificate verranno avviate a una valutazione biologica *in vitro* per le attività antimalarica, antitumorale, antischistosomiasi, anti-*Mycobacterium ulcerans*, anticolinesterasica. In funzione della classe chimica di sostanze isolate verrà valutata anche un'azione biologica antiossidante e un'attività sul sistema cardiovascolare. In base ai risultati ottenuti *in vitro*, per alcune attività potranno essere effettuati anche saggi *in vivo* su modelli animali sperimentali.

Risultati attesi nel triennio

Sarà sottoposta a studio fitochimico la *Curculigo pilosa*, *Hypoxidacea* del Benin, per isolare e caratterizzare sostanze a struttura norlignanica, simili alla pilosidina (Il Farmaco, 2001, 56: 353-356), per poter condurre altri studi di attività cardiovascolare *in vitro* e *in vivo*, e studi di attività antiossidante, data la natura polifenolica di questi composti.

Si intende intraprendere lo studio dell'*Acridocarpus* vivi, una *Malpighiaceae* usata nel Madagascar per il trattamento della bilarziosi: ricca in polifenoli, l'estratto butanologico della corteccia, a un primo *screening* biologico, ha presentato una buona attività citotossica (su cellule di epiteloma e raiobiosarcoma umano, $\text{IC}_{50} = 7,0 \mu\text{g/ml}$) e una buona attività anticolinesterasica (attività AChTE inibente = $0,01 \text{mg/ml} \div 1,0 \text{mg/ml}$).

Il progetto prevede lo studio dell'*Eleutherine bulbosa*, una *Iridacea* del Congo, utilizzata come antidiarroico e per il trattamento di disturbi coronarici. Un primo studio fitochimico ha portato all'isolamento e identificazione chimica di undici polichetidi tricyclici, di due nuovi naftopirani e un nuovo gentiobioside della diidroeleuterina, sostanze che saranno avviate a uno *screening* di attività su sistema cardiovascolare.

Si prevede, inoltre, lo studio di una nuova pianta, *Phymatodes scolopendria*, una pianta usata in Madagascar come antiasma.

Particolarmente interessante risulta anche l'*Heliconia psittacorum* del Benin, che a un primo *screening* di attività si è dimostrata attiva nei confronti del virus HIV

Trasferibilità dei risultati

Gli studi fitochimici e i conseguenti studi bio-farmacologici delle sostanze isolate dalle piante della Medicina Tradizionale dei Paesi in via di sviluppo sono in linea con i programmi dell'OMS (WHO *Traditional Medicine Strategy* 2002-2005) per la valorizzazione delle Medicine Tradizionali di questi paesi, ove possono rappresentare il più importante e fondamentale sistema di cura a basso costo delle malattie della povertà (malaria, bilarziosi, schistosomiasi). 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.

La tossicità degli inibitori delle proteasi e la loro interferenza con l'omeostasi cellulare: studio dei meccanismi subcellulari *in vitro* ed *ex vivo*

È stato ipotizzato che gli inibitori delle proteasi (PI) di HIV determinino un'alterazione del metabolismo lipidico con conseguente dislipidemia e una modificazione dell'omeostasi cellulare dovuta a un'alterazione dei processi che sovrintendono alla sopravvivenza cellulare stessa. In alcuni recenti lavori È stata anche ipotizzata una relazione tra PI e apoptosi. In particolare, gli inibitori delle proteasi (PI) di HIV sarebbero in grado di indurre effetti contrastanti: i) riducono rapidamente l'apoptosi di linfociti CD4 e CD8; ii) non alterano l'apoptosi in PBL blastizzati da donatori sani o in cellule CD4+ in coltura; iii) inducono invece apoptosi in cellule endoteliali. Ciò potrebbe indicare che l'immunoricostruzione osservata in pazienti sotto HAART possa anche essere dovuta a un effetto antiapoptotico dei PI mentre in cellule endoteliali potrebbe invece essere indotto un effetto citopatico di rilevanza clinica. La conoscenza dei meccanismi subcellulari coinvolti nella sensibilità cellulare ai vari PI risulta quindi di rilevante interesse sia in termini di tossicità che di immunomodulazione.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto mira all'individuazione delle alterazioni cellulari, biochimiche e molecolari indotte da PI che possano rendere conto tanto degli effetti citopatici osservati in pazienti affetti da AIDS dopo alcuni mesi di terapia quanto degli effetti terapeutici dovuti a fenomeni di immunoricostruzione. Tali informazioni potrebbero contribuire a massimizzare gli effetti terapeutici dei PI minimizzandone al contempo gli effetti collaterali. Infatti, l'individuazione di specifici *target* cellulari coinvolti nelle alterazioni citologiche indotte da PI può portare all'identificazione di *marker* di riferimento. D'altra parte i dati fin qui ottenuti (ad esempio su associazioni di *baby doses* di ritonavir seguite da lopinavir) sembrano fornire un utile contributo al miglioramento delle terapie correnti suggerendo, eventualmente, terapie aggiuntive atte a mitigare gli effetti indesiderati che si associano alla somministrazione di PI nella terapia dell'AIDS, o, per converso, a implementare il processo di *immunoreconstitution*.

Trasferibilità dei risultati

Refining terapeutico e individuazione di possibili impieghi terapeutici alternativi di PI

Le malattie infiammatorie croniche e le sindromi algiche croniche: studio dei meccanismi eziopatogenici e individuazione di nuove possibilità terapeutiche

1. L'emorfazone è un farmaco analgesico in vendita in Giappone come antinfiammatorio-analgesico. In collaborazione con un gruppo di chimici farmaceutici dell'Università di Firenze

valuteremo una serie di nuovi composti allo scopo di identificare molecole con la stessa o maggiore attività farmacologica dell'emorfazione ma con minori effetti collaterali.

2. In collaborazione con il William Harvey di Londra e con il *Laboratory of Molecular Immunology* del NIAID di Bethesda, studieremo il ruolo dei recettori dei peptidi formilati nell'eziopatogenesi del dolore a base infiammatoria e in alcune patologie croniche a base infiammatoria.

3. In collaborazione con l'università di Firenze, studieremo l'efficacia degli inibitori delle fosfodiesterasi 3, 4 e 5 nelle sindromi algiche a base infiammatoria. Ci proponiamo inoltre di studiare gli effetti di questi composti in modelli di bronchite cronica ostruttiva, di artrite reumatoide e malattie infiammatorie croniche intestinali.

4. In collaborazione con l'università di Napoli studieremo il ruolo dei cannabinoidi e il loro possibile utilizzo terapeutico nelle neuropatie.

5. Stiamo terminando uno studio sulle differenze genetiche e circadiane della risposta infiammatoria e nocicettiva. Abbiamo già dimostrato che ceppi geneticamente differenti rispondono in modo differente ad uno stimolo infiammatorio e investigheremo su quale base biochimica si fondi questa differenza.

6. Stiamo studiando, in collaborazione con una ditta d'elettromedicali, la possibilità di proporre nuovi modelli di dolore e nuove apparecchiature dedicate alla misura della risposta nocicettiva.

Risultati attesi nel triennio

I risultati del nostro lavoro dovranno esitare in un approfondimento dei meccanismi eziopatogenici alla base di alcune patologie infiammatorie come l'artrite reumatoide, la bronchite cronica ostruttiva e la colite ulcerosa e del dolore ad esse associato e delle sindromi dolorose croniche per cui non esistono ancora terapie efficaci. Inoltre, dallo studio di nuove entità chimiche saranno individuate quelle più attive, da proporre per un eventuale studio clinico.

Trasferibilità dei risultati

Dai risultati del nostro lavoro potranno essere indicati nuovi approcci per la terapia di patologie infiammatorie croniche e delle sindromi dolorose croniche per cui non esiste ancora una terapia efficace.

Le monografie di preparazioni farmaceutiche specifiche della Farmacopea Ufficiale (FU): la loro revisione a garanzia della qualità dei medicinali generici

La procedura per la richiesta di autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) di un medicinale generico prevede l'obbligo, da parte del richiedente, di presentare la documentazione relativa alla qualità del prodotto stesso che può fare riferimento a una monografia di forma farmaceutica finita presente in una farmacopea in vigore nella Unione Europea.

Al riguardo nella Farmacopea Ufficiale italiana è presente un considerevole numero di monografie.

L'evoluzione delle tecniche analitiche per il controllo della qualità dei prodotti medicinali, impone un continuo aggiornamento delle specifiche presenti in tali monografie. Infatti il riscontro della qualità del medicinale viene effettuato in questi casi con le procedure analitiche riportate nella monografia di farmacopea alla quale si fa riferimento. Tali procedure analitiche sono state messe a punto in tempi non recenti e possono essere, oggi, non idonee in particolare per un adeguato controllo delle impurezze specialmente quelle di degradazione.

Per quanto riguarda le monografie di preparazioni farmaceutiche specifiche presenti nella XI ed. della FU emerge quindi la necessità di una loro revisione a garanzia della qualità dei prodotti medicinali preparati negli attuali contesti produttivi.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto si propone pertanto, per alcuni medicinali generici di largo consumo che, per la qualità, fanno riferimento a monografie di farmacopea, di revisionare le rispettive monografie della FU procedendo, in particolare,

all'inserimento di nuove specifiche adeguatamente convalidate,

alla valutazione delle impurezze presenti nel prodotto medicinale finito e, quando pertinente, alla valutazione dei prodotti di decomposizione che si formano nel periodo di validità del medicinale,

la convalida di eventuali nuove metodiche analitiche.

La revisione di una monografia dovrà anche tener conto della eventuale presenza, in farmacopee nazionali di altri Paesi dell'UE, di monografie simili. In tale situazione il processo di revisione dovrà avvenire in collaborazione con le autorità di farmacopea dei Paesi interessati al fine di definire un unico testo armonizzato accettato nell'ambito dell'UE.

Un processo di armonizzazione simile può anche essere utilizzato per inserire nella FU nuovi testi di monografie di preparazioni farmaceutiche specifiche attualmente presenti in altre farmacopee nazionali dell'UE.

Trasferibilità dei risultati

Le monografie modificate verranno a far parte della nuova edizione della FU la cui uscita è prevista tra il 2007 e il 2008 e rappresenteranno requisiti minimi di qualità per i produttori dei relativi farmaci

L'informazione scientifica e le terapie non convenzionali

L'uso in Italia delle terapie non convenzionali (TnC) è divenuto una realtà che le Istituzioni stanno prendendo in seria considerazione.

Sia l'OMS che l'Unione Europea lavorano da tempo a linee guida che i vari paesi dovrebbero recepire.

È auspicabile che l'ISS faccia parte di un *team* a cui afferiscono rappresentanti delle Istituzioni, delle Università, della Ricerca in generale, dei legislatori, delle società scientifiche delle varie branche di TnC, tutti disposti a collaborare al fine comune della elaborazione di linee guida e per favorire una corretta divulgazione scientifica.

Considerata la realtà italiana, le indicazioni della FNOMCEO e l'ultima proposta di legge in materia di TnC, il nostro interesse si dovrebbe incentrare su alcune pratiche mediche come agopuntura, fitoterapia, medicina omeopatica, omotossicologia, medicina antroposofica, farmacoterapia tradizionale cinese, ayurveda, medicina tradizionale tibetana, medicina manuale (cioè osteopatia e chiropratica) e su alcune discipline bio-naturali di pertinenza non strettamente medica come naturopatia, shiatzu, riflessologia, massaggio cinese *tui na-qigong*, massaggio ayurvedico, pranopratica, *reiki*.

Si rende necessaria quindi una prossima attivazione (in parte già iniziata) di tutta una rete di contatti, di riunioni scientifiche per ciò che riguarda le TnC.

Strumenti come convegni, corsi, sito Internet messi a punto dall'ISS sono il primo passo per un dialogo tra le istituzioni e le diverse componenti delle medicine e pratiche non convenzionali.

Risultati attesi nel triennio

Lo scopo principale è quello di fare assumere all'Istituto Superiore di Sanità un ruolo centrale nell'ambito della Sanità e della Ricerca in Italia anche per tutto ciò che riguarda le direttive sulle medicine e pratiche non convenzionali.

Corretta divulgazione scientifica

Pianificazione di progetti di ricerca proposti dalle istituzioni e dai rappresentanti delle varie specialità mediche non convenzionali.

Trasferibilità dei risultati

Possibili risultati a breve termine potranno essere:

- Elaborazione di linee guida
- Definizione e eventuale approvazione definitiva da parte del Parlamento Italiano di una legge che regolamenti le medicine e pratiche non convenzionali.
- Risultati a medio e lungo termine:
- Pianificazione di progetti di ricerca pre-clinica per lo studio di attività terapeutiche di sostanze naturali presenti nella farmacopea europea o extraeuropea (specialmente asiatica). Alcuni ricercatori del Dipartimento del Farmaco lavorano da tempo su questo filone di ricerca.
- Pianificazione di studi clinici controllati.
- Introduzione nella pratica clinica corrente, di prodotti di origine naturale o di trattamenti al momento considerati non convenzionali.

Lipo-QoL: Studio osservazionale per la valutazione della qualità della vita in pazienti con infezione da HIV-1 sottoposti ad interventi correttivi chirurgici per lipodistrofia

Il progetto è sponsorizzato e coordinato dalla IV Divisione Malattie Infettive dell'IRCCS Spallanzani di Roma, mentre l'analisi dei dati è affidata al reparto di farmacologia e terapia delle malattie da virus presso il Dipartimento del Farmaco dell'ISS.

L'introduzione dei regimi altamente attivi (HAART) nel trattamento dell'infezione da HIV ha determinato una notevole riduzione di morbilità e mortalità legate a patologie HIV-correlate, comportando tuttavia l'insorgenza di nuovi effetti collaterali. Tra gli effetti collaterali frequentemente descritti in associazione alla HAART, la lipodistrofia rappresenta un fenomeno particolarmente stigmatizzante per il paziente, comportando un impatto negativo sulla sua qualità di vita. Lo studio in oggetto si pone l'obiettivo di valutare la qualità della vita del paziente prima e dopo interventi di chirurgia plastica correttivi di alcuni aspetti della sindrome lipodistrofica (ricostituzione delle zone lipoatrofiche del volto mediante applicazione di acido polilattico o poliacrilamide).

Risultati attesi nel triennio

Le informazioni saranno raccolte presso la IV Divisione di Malattie Infettive dell'IRCCS Spallanzani (Roma), su un campione di circa 100 persone, tramite uno studio randomizzato, controllato e longitudinale.

Trasferibilità dei risultati

L'analisi dei dati permetterà di valutare come un intervento di chirurgia plastica possa contribuire al miglioramento della qualità della vita in pazienti con immunodeficienza avanzata e con sindrome lipodistrofica..

Misura dell'interazioni proteina-proteina *in vivo* mediante un nuovo sistema reporter

L'obiettivo del progetto è quello di ottimizzare una strategia sperimentale che consenta di monitorare, sia *in vitro* che *in vivo*, le interazioni proteina-proteina che hanno luogo nelle diverse fasi del processo di trasduzione del segnale mediato dai recettori di membrana. Una tecnica comunemente usata per misurare il grado di prossimità molecolare tra due molecole, si basa sul fenomeno del trasferimento di energia per risonanza tra due fluorofori (FRET), che - stante una serie di parametri permissivi - avviene solo se le molecole distano meno di 100 Angstrom. *Transfer* di energia per risonanza in natura si verifica nei celenterati, tra il prodotto bioluminescente di certe luciferasi e il fluoroforo di alcune proteine fluorescenti (BRET). In tal caso un'interazione diretta tra le due proteine ottimizza la relazione spaziale tra i fluorofori, e il trasferimento per risonanza ha efficienza massima. Il BRET è stato sinora impiegato per rivelare interazioni proteina-proteina fondendo ai due *partner* in studio *Renilla luciferasi* (rLUC) e *Aequorea GFP*, rispettivamente. Tuttavia, poiché tra queste due proteine non vi è interazione, il segnale di risonanza è estremamente debole e l'impiego molto limitato. Studi da noi condotti dimostrano invece che l'uso di rLUC e *renilla GFP* (rGFP) permette un'interazione perfetta tra le due proteine e un segnale di risonanza molto più intenso. In questo progetto l'applicabilità del "enhance BRET" (eBRET) da noi sviluppato verrà valutata nello studio della trasduzione del segnale.

Risultati attesi nel triennio

I risultati verranno sviluppati in tre fasi.

a) Nella prima fase verranno condotti esperimenti atti ad identificare le caratteristiche strutturali che sono necessarie per l'interazione rLUC – rGFP. Utilizzando costrutti di fusione tra le due proteine si valuterà l'importanza dei rispettivi domini N- e C-terminali nel determinare l'interazione che produce eBRET. Inoltre inserendo in tali chimere un sito di idrolisi per la trombina o costruendo opportuni siti di affinità in rLUC e rGFP individualmente espresse nella stessa cellula, si misurerà la dipendenza del segnale eBRET dalla prossimità molecolare tra le due proteine.

b) Nella seconda fase si valuterà la capacità del sistema eBRET di rivelare la formazione di complessi tra diverse unità funzionali, coinvolte nel *pathway* di trasduzione del segnale recettoriale e nella desensitizzazione. Esprimendo in cellule tali proteine fuse alternativamente con rLUC e rGFP, si analizzerà in tempo reale lo svolgersi di interazioni recettore-recettore, recettore-G proteina, recettore-proteine del sistema di desensitizzazione, quali arrestine e chinasi. Si valuterà inoltre come tali eventi sono modulati da farmaci dotati di differente efficacia.

c) Nella terza fase si realizzerà un modello di topo transgenico esprimente, sotto il controllo di un promotore miocardio-specifico, le proteine d'interesse fuse ai *partner* del BRET, precedentemente utilizzate. Ciò consentirà di valutare come interazioni responsabili del *signaling* del recettore Beta2 adrenergico sono alterate in condizioni fisio-patologiche.

Trasferibilità dei risultati

Nonostante i progressi nella conoscenza dei meccanismi di trasduzione del segnale, rimane problematico valutare come le loro alterazioni siano causa di fisiopatologia. Le interazioni molecolari vanno misurate *in vitro*, in sistemi ben diversi dal naturale ambiente intracellulare. Tuttavia, nella cellula vivente, queste interazioni formano un circuito altamente integrato di componenti interconnessi, il cui risultato finale non può essere dedotto semplicemente dalla somma delle sue parti. Vi è attualmente una scarsità di modelli sperimentali adeguati per lo studio della trasduzione del segnale nel sistema intatto. La principale ricaduta di questo progetto consiste nella messa a punto di una piattaforma sperimentale, che potrebbe cambiare

radicalmente il modo con cui vengono studiate le interazioni tra molecole coinvolte nella trasduzione del segnale.

La strategia validata in questo studio renderà possibile analizzare la dinamica delle interazioni molecolari in cellule intatte, preservando la complessità del *network* in cui avvengono e la gerarchia temporale che le regola.

Modelli sperimentali per lo studio degli effetti avversi sul sistema riproduttivo di farmaci somministrati durante lo sviluppo

Nell'ambito della prevenzione dei rischi derivanti dall'uso di farmaci, la UE ha sottolineato l'importanza di incrementare le conoscenze sul loro utilizzo in pediatria (<http://pharmacos.eudra.org/F2/Doc>). Il progetto intende pertanto sviluppare studi preclinici per caratterizzare gli effetti avversi sul sistema riproduttivo maschile indotti dalla somministrazione di farmaci durante fasi critiche di sviluppo postnatale. Mancano infatti nei modelli sperimentali informazioni sulla tossicità riproduttiva dei farmaci in questa fase di sviluppo e sugli eventuali effetti a lungo termine nell'adulto. Saranno ritenuti prioritari alcuni farmaci antitumorali e ormoni, con maggiore uso in età pediatrica e adolescenziale; l'attività di ricerca sarà principalmente focalizzata sulla valutazione dell'omeostasi ormonale a livello testicolare ed ematico durante lo sviluppo nel topo CD1 e sulle eventuali conseguenze a lungo termine sulla spermatogenesi.

Lo studio prevede: a) la selezione dei principi attivi sulla base delle informazioni tossicologiche disponibili e rilevanza d'uso in età pediatrica e adolescenziale; b) la somministrazione ripetuta dei principi attivi nel topo CD1, prima e dopo lo svezzamento; saranno scelte dosi e vie di somministrazioni rilevanti per specifici trattamenti farmacologici c) la caratterizzazione degli effetti a diversi tempi, durante e dopo la somministrazione del farmaco e fino all'età adulta, attraverso la valutazione di parametri morfologici, seminologici, biochimici e istologici/istomorfometrici.

Risultati attesi nel triennio

Il modello sperimentale consentirà, attraverso una valutazione integrata dei diversi indicatori di tossicità riproduttiva di:

definire per tutti i parametri esaminati le correlazioni dose-effetto a livello di cellule e tessuti bersaglio e selezionare gli *endpoint* di tossicità riproduttiva sensibili (in collaborazione con U.O. dell'ENEA-Casaccia).

incrementare le conoscenze sull'omeostasi ormonale nel testicolo del topo CD1 durante lo sviluppo postnatale attraverso la determinazione degli ormoni coinvolti nella biosintesi steroidea a livello della cellula del *Leydig* (Progesterone, 17OH-Progesterone, androsteneione, testosterone, di-idrotestosterone, 17 β -estradiolo). I dati ottenuti consentiranno una più accurata definizione delle finestre di esposizione al farmaco e dei tempi di valutazione dei parametri in seguito ai trattamenti. Questi risultati saranno integrati da informazioni sul metabolismo steroideo a livello dei microsomi epatici in collaborazione con U.O. ISS.

effettuare una valutazione comparativa del grado di tossicità riproduttiva di farmaci ad analogo attività clinica, sia a breve termine sullo sviluppo puberale sia a lungo termine sull'eventuale reversibilità degli effetti;

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti in questi studi *in vivo* forniscono informazioni sul grado di interferenza di alcuni farmaci sullo sviluppo puberale e sugli eventuali effetti a riscontrabili nell'età adulta. Le possibili interazioni sui parametri riproduttivi possono pertanto essere predittivi di eventi critici da valutare nei *trial* clinici e negli studi epidemiologici, nei soggetti sottoposti a terapie in età pediatrica e adolescenziale

L'ottimizzazione delle metodologie per la determinazione degli *endpoint* riproduttivi consentirà una loro utilizzazione in studi condotti su altri modelli animali.

L'informazione acquisita potrà essere trasferita nelle attività regolamentative per la valutazione pre-clinica di farmaci usati in pediatria.

Modulazione dell'apoptosi nei tumori neuroepiteliali

La regolazione della crescita tumorale è determinata dal complesso bilancio tra proliferazione e morte cellulare per apoptosi. I sistemi di regolazione dell'apoptosi sono perciò divenuti di grande interesse sia per i meccanismi patogenetici che determinano l'insorgere della neoplasia, sia come possibili *target* terapeutici che consentirebbero il controllo della crescita tumorale. L'individuazione di markers e indicatori di suscettibilità alla terapia (radiante o chimica) sono quindi oggetto di indagini di tipo sia sperimentale che clinico. È infatti di grande rilevanza l'individuazione a) di *target* terapeutici pro-apoptotici; b) di composti "sensibilizzanti" (*booster*) che agiscano su questi *target*. In generale, il meccanismo più studiato di induzione apoptotica, ad esempio recettore-mediato (detto di Tipo I), passa per una complessa cascata di eventi che coinvolge solo tardivamente i mitocondri. Tuttavia, sta assumendo particolare importanza in chemio- e radio-terapia un *pathway* "parallelo" che coinvolgerebbe direttamente il mitocondrio nelle fasi molto precoci.

Risultati attesi nel triennio

Il mitocondrio potrebbe essere essenziale per una "efficiente" risposta alla terapia pro-apoptotica (chimica, radiante o biologica) e alcuni degli agenti impiegati potrebbero "sensibilizzare" all'apoptosi le cellule neoplastiche proprio agendo a livello mitocondriale (effetto *booster*).

Trasferibilità dei risultati

Gli obiettivi di questo progetto convergono sulla possibilità di modulare le varie funzioni cellulari coinvolte nella suscettibilità a chemio- o radioterapia- con potenziale impatto terapeutico sui tumori solidi

Modulazione farmacologica di malattie degenerative dell'invecchiamento: uso delle tossine batteriche in terapia

Le tossine di natura proteica rappresentano non solo uno dei principali fattori di virulenza per i batteri patogeni ma anche un prezioso strumento di indagine per la definizione dei meccanismi molecolari che regolano processi sia fisiologici che patologici. Negli ultimi anni ha acquistato sempre maggiore rilevanza un gruppo di tossine batteriche capaci di modificare enzimaticamente le piccole proteine G della famiglia Rho, coinvolte in numerosi processi cellulari tra cui il differenziamento e la senescenza. Alterazioni del differenziamento cellulare sono alla base dello sviluppo di alcune malattie largamente diffuse quali malattie degenerative muscolari e cancro. Le tossine batteriche note per la loro azione sulle piccole proteine G, causano sia l'inibizione di tali proteine (tossine A e B del *Clostridium difficile*) che la loro attivazione permanente (CNF1 di *Escherichia coli*). Il presente progetto si propone di studiare il legame tra lo stato di attivazione delle proteine G e differenziamento cellulare, senescenza o cancro. Grazie alla possibilità di inibire o attivare le proteine della famiglia Rho in maniera altamente specifica, le tossine possono rappresentare uno strumento importante per la messa a punto di sostanze farmacologicamente attive con potenziale utilità terapeutica.

Risultati attesi nel triennio

La principale finalità di questo progetto sarà quella di definire le modalità tramite cui le tossine in oggetto interferiscono con i processi di differenziamento, senescenza e cancerogenesi.

In particolare, ci focalizzeremo a) sul coinvolgimento di fattori di trascrizione dipendenti dalle proteine Rho (es. NF-kB); b) sui meccanismi attraverso i quali le tossine modulano l'apoptosi e quindi i processi di trasformazione cellulare; c) sulla possibilità di condizionare, tramite tossine che modulano le Rho GTPasi, il differenziamento cellulare; d) sul ruolo svolto dalle Rho GTPasi nei processi degenerativi e di invecchiamento.

L'insieme di queste ricerche dovrebbe fornire non solo una conoscenza dei meccanismi alla base di questi fenomeni fisiologici e patologici ma ci consentirebbe anche di identificare le potenzialità terapeutiche delle tossine.

Trasferibilità dei risultati

L'individuazione tramite tossine dei meccanismi molecolari alla base di processi degenerative quali trasformazione, alterato differenziamento e invecchiamento, può fornire nuovi bersagli terapeutici. Allo stesso tempo, le tossine che agiscono sulle Rho GTPasi (in forma nativa o come proteine ricombinanti) possono rappresentare una nuova classe di sostanze farmacologicamente attive e potenzialmente utilizzabili in strategie terapeutiche innovative.

Monitoraggio dei pazienti trattati con prodotti per terapia genica e cellulare somatica

Gli attuali limiti delle conoscenze sui prodotti per terapia genica e cellulare somatica e la rilevanza delle loro indicazioni terapeutiche merita un'attenzione particolare da parte dell'Autorità Sanitaria nazionale. La definizione della loro efficacia e sicurezza a medio e lungo termine non è ancora possibile poiché le ricerche sul loro potenziale terapeutico sono in fase iniziale e l'esperienza clinica si sta formando in studi di piccole dimensioni, di breve durata e con indicazioni diverse. Inoltre, i risultati di queste sperimentazioni hanno sollevato una serie di interrogativi, e la risposta ad alcuni di loro è di fondamentale importanza per proseguire lo sviluppo di vari protocolli. In alcuni casi poi sono già state segnalate reazioni avverse gravi, che hanno portato alla sospensione delle sperimentazioni. Occorre, quindi, esaminare attentamente ogni risultato di tali terapie per saper riconoscere quando e in quale misura il trattamento è efficace, e quali tipi di preparazione sono più idonei per ottenere una risposta ottimale nelle varie indicazioni.

Il Ministro della Salute ha emanato, su proposta della Commissione per l'accertamento dei requisiti dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione, un decreto (DM 02/03/2004) che istituisce presso l'Istituto la banca dati per il monitoraggio dei pazienti arruolati in sperimentazioni cliniche che prevedono l'impiego di questi prodotti.

La gestione della banca è di competenza della Commissione, e il monitoraggio dell'andamento dei pazienti è affidato a sette gruppi di esperti, ciascuno composto da almeno tre ricercatori dell'Istituto con esperienza nella valutazione di questo tipo di sperimentazioni, suddivisi in base a determinate competenze. Altri due gruppi di lavoro si occupano degli aspetti di statistica e di informatica. Essi saranno collegati con la banca e fra loro per via telematica e, attraverso l'Agenzia Italiana del Farmaco, potranno consultare presso la CINECA i *dossier* originali dei prodotti inviati per via elettronica, come previsto dalla recente normativa. Il sistema operativo consente ai singoli esperti di seguire il flusso dei dati nella banca, di esaminare le sperimentazioni di propria competenza e di consultarsi allorché l'andamento dei trattamenti suggerirà l'opportunità di avviare specifici approfondimenti. Alla fine di ogni anno solare viene redatta una relazione sull'andamento delle varie sperimentazioni.

L'Istituto ha messo a punto una scheda elettronica per la raccolta dei dati dei pazienti, che saranno immessi per via telematica a cura dello sperimentatore responsabile. L'applicazione è basata su architettura web-distribuita ed è stata concepita in modo che l'accesso dell'utenza avvenga su un canale sicuro mediante autenticazione. Le informazioni saranno trattate nel

rispetto delle vigenti normative sulla tutela della *privacy*. A differenza del “*case report form*”, saranno raccolti solamente i dati essenziali sugli esiti del trattamento, per eventuali approfondimenti sulla sua sicurezza ed efficacia. I dati da inserire dovranno essere indicati dal proponente nel protocollo clinico presentato a corredo della domanda di autorizzazione alla sperimentazione clinica e approvati dalla Commissione. Essi dovranno riguardare gli andamenti clinici, alcuni esami di diagnostica strumentale e una serie di *marker* molecolari, scelti in base alla tipologia del prodotto e della patologia trattata, nonché alcune verifiche sulla biodistribuzione del materiale iniettato (Decreto ISS 8 novembre 2004).

La segreteria della Commissione dell'Istituto assegna un codice ad ogni sperimentazione approvata, al centro clinico dove si svolgerà e al ricercatore responsabile dell'immissione dei dati nella banca.

L'autorizzazione al trattamento di ciascun paziente è rilasciata sulla base del parere espresso dal gruppo di esperti di competenza.

Risultati attesi nel triennio

La banca rappresenta uno strumento adeguato per

Accumulare informazioni utili per consolidare nel tempo, attraverso un *follow up* a lungo termine dei pazienti trattati, le conoscenze sulla loro sicurezza d'impiego e sui loro vantaggi terapeutici dei vari prodotti per terapia genica e cellulare somatica.

Acquisire informazioni di ritorno per ottimizzare le preparazioni da impiegare e i protocolli clinici nelle varie malattie

Confrontare efficacia e sicurezza di preparazioni analoghe e/o assimilabili fra loro.

Trasferibilità dei risultati

I risultati consentiranno di:

- Avviare un processo di verifica dei criteri di valutazione utilizzati per autorizzare la sperimentazione clinica di prodotti per terapia genica e cellulare somatica.
- Validare i modelli sperimentali impiegati nella definizione dell'efficacia e sicurezza di questi prodotti.
- Monitorare il corretto impiego di questi prodotti.

Monitoraggio dell'uso del farmaco adefovir dipivoxil (Hepsera) in pazienti con infezione da HBV

Questo programma rientra nelle attività di monitoraggio definite dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), mirate a particolari farmaci recentemente introdotti nell'uso clinico. Il monitoraggio, regolato da una specifica determinazione AIFA (n. 8/2004, G.U. n. 278 del 26/11/2004), è svolto direttamente dall'ISS. Il farmaco oggetto della ricerca è destinato a pazienti affetti da infezione da HBV con particolari condizioni clinico-terapeutiche, e il monitoraggio prevede la raccolta presso il Dipartimento del Farmaco dell'ISS di dati anamnestici, clinici e di laboratorio in corso di trattamento con questo nuovo antivirale, al fine di definirne l'impatto sulla malattia di base e la tollerabilità. L'inserimento dei dati avviene via web da parte dei medici partecipanti al monitoraggio. Sull'andamento del progetto vengono periodicamente aggiornati l'AIFA, gli Uffici Farmaceutici Regionali, e i partecipanti alla ricerca. Una descrizione del progetto con un collegamento al sito relativo è inoltre stata pubblicata sul sito del Dipartimento del Farmaco dell'ISS.

Risultati attesi nel triennio

È prevista l'analisi di dati relativi a diverse centinaia di pazienti. Si prevede di raccogliere informazioni a livello nazionale sulle caratteristiche dei pazienti in trattamento, sulla risposta al trattamento e sulla sua sicurezza. I parametri di risposta del trattamento che saranno valutati comprendono marcatori di laboratorio (transaminasi, HBV-DNA, antigene E), di evoluzione

della malattia (epatocirrosi, epatocarcinoma, trapianto di fegato), e di tossicità (eventi avversi seri e eventi avversi di grado severo o pericoloso per la vita).

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni raccolte permetteranno di contribuire alla definizione del profilo di efficacia e tossicità del farmaco, e quindi a una sua migliore utilizzazione, anche in relazione alle altre terapie già esistenti per l'infezione da HBV (lamivudina, interferon).

Monitoraggio dell'uso del farmaco enfuvirtide (Fuzeon) in pazienti con infezione da HIV

Questo programma, rientrante nelle attività di monitoraggio definite dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), è finalizzato alla valutazione degli effetti di nuovi farmaci antiretrovirali recentemente introdotti nell'uso clinico.

Il farmaco oggetto della ricerca (enfuvirtide) viene attualmente impiegato, in assenza di opzioni terapeutiche alternative, nell'ambito di regimi terapeutici di salvataggio in soggetti già sottoposti a tutte le possibili combinazioni (HAART) con farmaci appartenenti alle altre tre classi (NRTI, NNRTI, PI).

L'attività di monitoraggio, regolata da una specifica determinazione AIFA (n. 8/2004, G.U. n. 278 del 26/11/2004), viene direttamente svolta presso dall'Istituto Superiore di Sanità attraverso la periodica ricezione via web di schede elettroniche trasmesse dai centri clinici partecipanti. Il contenuto delle schede comprende dati anamnestici, dati clinico-laboratoristici e elementi per valutazioni farmaco-economiche.

Aggiornamenti sull'andamento del progetto saranno periodicamente trasmessi all'AIFA, agli Uffici Farmaceutici Regionali e a tutti i centri clinici partecipanti al progetto. All'interno del sito web del Dipartimento del Farmaco (ISS) è attualmente disponibile la descrizione del progetto e un collegamento al relativo sito.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi dei dati verrà effettuata su un campione di alcune centinaia di pazienti. È prevista la raccolta di informazioni a livello nazionale sulle caratteristiche dei pazienti in trattamento, sulla loro risposta al trattamento e sulla sicurezza di quest'ultimo.

I parametri di valutazione della risposta al trattamento saranno costituiti dai marcatori immunologici e virologici di efficacia (CD4+, HIV-RNA), da indici di sicurezza (eventi avversi seri e eventi avversi di grado severo o pericoloso per la vita) e da indicatori farmaco-economici (ospedalizzazioni, giorni persi di lavoro).

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni raccolte forniranno un contributo alla definizione del profilo di efficacia e di sicurezza del farmaco, e quindi a una sua migliore utilizzazione.

Nuovi ligandi per il Recettore Oppioide della nocicettina (NOP): sintesi, proprietà farmacologiche e potenziale attività analgesica

Il dolore è un processo complesso e dinamico che coinvolge parecchi sistemi neurotrasmettitori/neuromodulatori per lo più intercorrelati. Esso può essere classificato in funzione dell'eziologia, intensità e durata e il suo trattamento è influenzato anche da aspetti di natura psicologica e dall'età del paziente. Per alcuni tipi di dolore sono disponibili efficaci strumenti farmacologici, oppiacei e antiinfiammatori non steroidei, ma gli effetti collaterali e di assuefazione rendono estremamente attuale la ricerca di nuovi e più sicuri antidolorifici. La scoperta di un quarto recettore oppioide, nociceptin (NOP) Receptor, ha aperto recentemente nuove prospettive per lo sviluppo di molecole non peptidiche attive nel trattamento del dolore.

Eventuali farmaci agonisti e antagonisti della nocicettina potrebbero esplicitare un largo spettro di attività terapeutiche, da quella ansiolitica, antiepilettica o analgesica spinale per gli agonisti a quella analgesica o nootropica per gli antagonisti. A tutt'oggi, relativamente pochi derivati sintetici di natura non peptidica sono stati individuati come ligandi selettivi esogeni del recettore NOP. Gli studi da noi condotti in questo campo hanno portato all'individuazione di alcuni interessanti prototipi molecolari antagonisti della nocicettina. I risultati sin qui ottenuti costituiscono il punto di partenza per lo sviluppo e l'ottimizzazione di altre molecole più attive e selettive.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca articolata in più fasi fornirà risultati relativamente ai seguenti aspetti:

Individuazione di nuovi *scaffolds* molecolari mediante tecniche di *Drug Design*. Saranno effettuati anche studi di *docking* recettoriale sul modello 3D del recettore NOP.

Ottenimento mediante Sintesi Chimica delle strutture ipotizzate. L'identificazione delle strutture avverrà mediante tecniche spettrometriche, in particolare Risonanza Magnetica Nucleare e spettrometria di Massa.

Profilo farmacologico dei composti mediante *test in vitro*. Le prove saranno orientate a chiarire l'affinità e l'efficacia dei composti come anche la selettività rispetto agli altri recettori oppioidi.

Profilo farmacologico dei composti mediante *test in vivo*, comportamento e tossicità.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno oggetto di pubblicazioni e comunicazioni a congresso.

Patogenesi e farmacologia sperimentale dell'ipertrofia cardiaca patologica

L'ipertrofia ventricolare patologica è caratterizzata da incremento delle dimensioni dei cardiomiociti, da fibrosi interstiziale, da attivazione di geni fetali cardiaci, e da un aumentato rischio di morte improvvisa, infarto del miocardio e scompenso cardiaco. Insorge in risposta a una varietà di stimoli patologici quali protratto sovraccarico emodinamico, catecolamine, o alterazioni genetiche a carico delle proteine sarcomeriche. La persistenza dello stimolo e il cronico incremento della massa ventricolare conducono inesorabilmente a un progressivo deterioramento della funzione cardiaca. Nonostante l'intensa attività di ricerca, i precisi meccanismi che sono alla base del processo di innesco e mantenimento dell'ipertrofia non sono noti, e, ovviamente, poco è conosciuto sulla possibilità di un intervento terapeutico che sia in grado di prevenirne l'evoluzione maladattativa.

Per diverse ragioni, grande attenzione è stata posta sul ruolo dell'attivazione cronica del sistema β -adrenergico nella genesi dell'ipertrofia cardiaca secondaria a sovraccarico emodinamico. È da rimarcare che un fenotipo cardiaco analogo a quello riscontrato in presenza di una iperstimolazione adrenergica si riscontra in presenza di un incrementato carico pressorio. Studi eseguiti in topi *knockout*, in cui adrenalina e noradrenalina sono mancanti, indicano che le catecolamine circolanti sono indispensabili per lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca in risposta all'incremento pressorio. Se uno tiene conto che la distruzione dei geni che codificano per i recettori adrenergici $\alpha 1a/c$ - e $\alpha 1b$, che costituiscono la quasi totalità dei recettori alfa adrenergici cardiaci, non influenza lo sviluppo dell'ipertrofia, è ragionevole ipotizzare che la stimolazione cronica dei recettori β -adrenergici è critica per la comparsa di ipertrofia patologica. Un'ipotesi questa corroborata dal fatto che un aspetto molecolare caratteristico dell'ipertrofia cardiaca da sovraccarico emodinamico è la marcata inibizione dell'intero sistema di trasduzione del segnale β -adrenergico con evidenti alterazioni quantitative nel corredo di molecole che ne mediano trasduzione e attenuazione. Al momento non è noto se questi cambiamenti siano cause o solo conseguenza del processo patologico.

Risultati attesi nel triennio

Secondo alcuni, l'attenuazione del segnale β -adrenergico (desensibilizzazione) avrebbe un effetto benefico in quanto proteggerebbe il cuore da un'eccessiva stimolazione adrenergica. Secondo un'altra visione, invece, i cambiamenti sono deleteri perché contribuirebbero: 1-al progressivo deterioramento della funzione cardiaca, attraverso la perdita del supporto adrenergico alla contrattilità del miocardio, e 2-allo sviluppo di ipertrofia cardiaca patologica mediante l'abilitazione del recettore β -adrenergico a una segnalazione intracellulare caratteristica dei fattori di crescita. Per risolvere il problema realizzeremo una serie di studi preclinici in cui saranno analizzati gli effetti sul ventricolo sinistro del sovraccarico pressorio cronico in topi transgenici β_2 -Gs e topi *knockout* per i recettori adrenergici β_1 e β_2 :

1. Nel primo caso abbiamo modificato i dispositivi di trasduzione del segnale β -adrenergico mediante l'introduzione nel miocardio di recettori adrenergici (β_2 -Gs) resi impervi alla desensibilizzazione. Lo scopo è quello di garantire un permanente supporto adrenergico alla contrazione miocardica durante la fase di attenuazione del segnale.

2. Nel secondo caso i topi mancano dei principali recettori adrenergici cardiaci; questo per verificare se le principali funzioni connesse al recettore quali acquisizione della conformazione attiva, legame con la G proteina e interazione con le molecole che operano la desensibilizzazione, sono necessarie per lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca.

In aggiunta, valuteremo gli effetti del propranololo in topi congenici *knockout* per i recettori beta-adrenergici cardiaci per identificare i target molecolari attraverso cui il propranololo esplica la sua attività anti-ipertrofica.

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 individuare nuove strategie terapeutiche.

Nel primo caso ci si attende di ottenere e divulgare dati sul ruolo di alcune molecole nel promuovere il processo di ipertrofia cardiaca patologica. È logico aspettarsi che la strategia proposta in questo studio possa dare risultati di interesse generale e dunque di larga trasferibilità nel campo della ricerca sanitaria. I modelli animali e cellulari che verranno messi a punto in tale studio costituiscono anche un elemento di trasferibilità in altri laboratori e possono essere facilmente impiegati in altre ricerche sperimentali di patologia del miocardio.

Nel secondo caso, il possibile chiarimento dei processi alla base dell'efficacia di certe terapie farmacologiche potrebbe stimolare nuovi *trial* clinici con farmaci mai sinora utilizzati in campo cardiologico e vascolare.

Patogenesi e terapia dell'insufficienza cardiaca

1) recuperare la contrattilità di aree di miocardio infartuato mediante terapia cellulare e contrastare farmacologicamente il fenomeno dell'apoptosi e la comparsa dell'ipertrofia cardiaca maladattativa. A tal proposito, si sperimenterà un approccio basato sull'impiego di mioblasti scheletrici (cellule satelliti), utilizzando un modello murino di scompenso indotto da sovraccarico pressorio. È presumibile che la colonizzazione e il differenziamento terminale di cellule satelliti nel miocardio in scompenso siano negativamente influenzati da quegli stessi fattori che hanno determinato la scomparsa dei miocardiociti originali. Così, si sperimenterà un protocollo in cui l'introduzione di cellule staminali verrà anche associata a terapia farmacologica con due famiglie di molecole potenzialmente in grado di ostacolare il circolo vizioso di ipertrofia e apoptosi dello scompenso.

2) modificare attraverso interventi di terapia genica, i meccanismi di trasduzione del segnale β -adrenergico cardiaco. Nel tentativo di mantenere la gittata cardiaca nella norma il cuore

innesca una serie di meccanismi di compenso tra cui l'iperstimolazione simpatica. Si presume che il perdurare di tale stato induca un fenomeno di desensibilizzazione cronica e down-regulation del recettore β -adrenergico. Sebbene manchi una dimostrazione diretta, si pensa che esista una relazione causa-effetto tra l'esaltato stimolo desensitizzante e l'insorgere dei processi ipertrofico-degenerativi che instaurano lo scompenso. Se l'ipotesi della desensibilizzazione maladattativa dovesse essere vera, l'inibizione dei meccanismi di desensibilizzazione o l'introduzione nel ventricolo sinistro di recettori β -adrenergici resistenti alla desensibilizzazione dovrebbero determinare un miglioramento della funzione sistolica cardiaca e l'interruzione del circolo vizioso che lega la disfunzione sistolica con il progressivo peggioramento della funzione cardiaca.

Risultati attesi nel triennio

Valutare il destino differenziativo delle cellule staminali (cellule satelliti) sia *in vitro* (colture con miocardiociti) che *in vivo* (trapianto intraparietale ventricolare sinistro)

Determinare gli effetti funzionali della terapia cellulare in cuori con *deficit* sistolico per perdita di massa cardiaca (infarto del miocardio)

Evidenziare il fenomeno della desensibilizzazione del recettore β -adrenergico nell'insufficienza cardiaca cronica

Valutare *in vivo* il rapporto tra desensibilizzazione del recettore β 1-adrenergico e l'evoluzione temporale dell'insufficienza cardiaca

Prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV attraverso l'allattamento materno nei paesi con risorse limitate

I regimi antiretrovirali brevi sono in grado di ridurre la trasmissione del virus HIV dalla madre al bambino al momento del parto, tuttavia la loro efficacia viene poi parzialmente annullata dalla successiva trasmissione associata all'allattamento materno. Nei paesi industrializzati la raccomandazione per le donne HIV-positive di non allattare ha di fatto abolito la trasmissione postnatale. Nei Paesi in via di sviluppo tuttavia, l'allattamento al seno presenta, nei confronti dell'allattamento artificiale, numerosi vantaggi dal punto di vista nutrizionale, immunologico, economico, logistico e socio-psicologico che influenzano in modo decisivo la scelta della madre. È necessario pertanto mettere a punto una strategia che permetta l'allattamento materno senza essere associata al rischio di trasmettere il virus HIV.

Il rischio di trasmissione postnatale è stato dimostrato essere direttamente correlato ai livelli di HIV-RNA nel latte materno. Può essere ipotizzato che una terapia HAART somministrata prima del parto e durante l'allattamento sia in grado di rendere non determinabile la carica virale nel latte e che quindi l'allattamento materno in corso di terapia HAART sia associato a un rischio sostanzialmente ridotto di trasmissione.

Lo scopo di questo progetto è di valutare l'efficacia e la sicurezza di una terapia HAART somministrata alle donne HIV-positive durante la gravidanza e fino a 6 mesi dopo il parto nel prevenire la trasmissione del virus associata all'allattamento materno.

Lo studio verrà effettuato su 300 coppie di donne/bambini in Mozambico.

Risultati attesi nel triennio

Determinare il tasso di trasmissione dell'HIV associato all'allattamento materno in una coorte di bambini allattati al seno da donne che ricevono una terapia antiretrovirale potente

Valutare la sicurezza e la tollerabilità della terapia antiretrovirale somministrata alle madri durante la gravidanza e durante l'allattamento

Valutare l'efficacia di una terapia HAART utilizzata durante la gravidanza e al momento del parto nel ridurre la trasmissione in utero e *intrapartum*

Valutare la possibile emergenza di resistenze virali nelle donne che ricevono una terapia HAART per la prevenzione della trasmissione materno-infantile

Valutare la morbilità e la mortalità nei bambini

Valutare la morbilità e la mortalità nelle donne che allattano al seno.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio potrà contribuire a definire le linee guida per la prevenzione della trasmissione materno-infantile nei paesi con risorse limitate. Se lo studio dimostrerà che i tassi di trasmissione dalla madre al bambino in corso di allattamento sono fortemente ridotti quando le donne assumono una terapia antiretrovirale potente, l'allattamento materno "protetto" (in corso di HAART) potrà rappresentare una possibile opzione per le donne nei paesi con risorse limitate che non siano in grado di effettuare l'allattamento artificiale. La protezione conferita dall'allattamento materno nei confronti della morbilità e della mortalità infantile rappresenterebbe un importante fattore nella scelta per le donne HIV-positive.

Produzione di anticorpi monoclonali umani in forma scFv per la diagnosi e terapia dei tumori

La costruzione di librerie fagiche che esprimono frammenti anticorpali in forma di *single chain fragment variables* (scFv) consente la generazione di un tipo di anticorpi che per caratteristiche strutturali e funzionali risultano particolarmente adeguati per un uso applicativo. Infatti, la derivazione umana degli scFv riduce i rischi di reazione avverse mentre le ridotte dimensioni del frammento immunoglobulinico consentono una rapida *clearance* ematica e tissutale e a una scarsa captazione da parte del fegato e di altri organi. L'estrema flessibilità del gene codificante per gli scFv permette una serie di manipolazioni dell'anticorpo che includono i) maturazione dell'affinità attraverso mutagenizzazioni sito-mirate, ii) legame con chemochine quali IL-2, TNF o enzimi capaci di convertire farmaci inerti in potenti citotossici, iii) i costi di produzione e lo sviluppo in qualità dell'anticorpo può essere effettuato mediante fermentazione batterica abbattendo i costi per lo sviluppo e i relativi saggi di innocuità. Il CEA è un antigene tumore associato espresso ad alti livelli su diversi tipi di forme neoplastiche incluse quelle che sono contraddistinte da forme di resistenza innata al trattamento chemioterapico. Pertanto, la selezione e caratterizzazione di scFv anti-CEA può rappresentare la prima fase per la costruzione anticorpi monoclonali da utilizzare per la diagnosi e terapia dei tumori.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi del progetto consistono nella selezione, produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali umani in forma scFv capaci di reagire in modo specifico con varianti del CEA differenzialmente espresse su ben definite classi di tumori che includono il carcinoma gastrico, il carcinoma polmonare, il melanoma e alcuni tipi di leucemie. Questi anticorpi dovranno possedere tutte quelle caratteristiche strutturali e funzionali per poter essere considerati dei potenziali composti antitumorali: saranno di origine umana e pertanto poco o nulla immunogenici; si dovranno legare con buona affinità con epitopi distribuiti nella frazione extracellulare del CEA mentre la loro reattività con tessuti normali sarà del tutto trascurabile e comunque priva di effetti avversi. Per l'isolamento di anticorpi monoclonali così concepiti verranno utilizzate varie librerie anticorpali sintetiche già in possesso della unità operativa che intende affrontare lo sviluppo del progetto e varie isoforme del CEA ottenute mediante espressione di geni codificanti per specifiche isoforme. Queste includono il CEACAM1 espresso in melanomi metastatici, carcinomi polmonari e alcuni tipi di leucemie (AML) e il CEACAM5-6 presente in modo estremamente elevato in carcinomi intestinali. Pertanto la selezione di scFv verrà effettuata attraverso ibiopanning di librerie fagiche anticorpali su ben

definite varianti del CEA. In questo modo si otterranno anticorpi monoclonali umani diretti in modo specifico e selettivo verso antigeni tumore associato di elevata rilevanza clinica.

Trasferibilità dei risultati

Anticorpi monoclonali in forma scFv specificamente diretti verso le varie isoforme del CEA e eventuali loro derivazioni ottenute mediante manipolazioni geniche (mutazioni sito dirette) potranno essere utilizzati per la diagnosi e terapia dei solidi attraverso legame con specifici composti radioattivi ma anche nella inibizione della proliferazione e metastatizzazione di cellule cancerose.

Progetto per la sorveglianza nazionale sul trattamento antiretrovirale in gravidanza

Il progetto, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, è svolto in collaborazione con infettivologi, ginecologi e pediatri che seguono donne HIV-positivo in gravidanza e i loro neonati. Obiettivo del progetto, avviato alla fine del 2001, è la sorveglianza sul trattamento antiretrovirale in gravidanza e dei suoi effetti sulla madre, sullo sviluppo embrionale e fetale e sul neonato.

Alla data odierna sono pervenute oltre 1000 comunicazioni di gravidanza dai medici segnalatori. I medici partecipanti e i membri *dell'advisory board* del progetto ricevono periodicamente un *report* sullo studio. Lo studio ha carattere nazionale (oltre 30 centri partecipanti su tutto il territorio nazionale) e ha raccolto importanti informazioni, che comprendono aspetti demografici e clinici sulle caratteristiche delle donne HIV-positivo in gravidanza, dati di sicurezza nella madre, andamento clinico e immunologico della infezione da HIV durante la gravidanza, uso di farmaci antiretrovirali durante la gravidanza e il parto, ricoveri e relative patologie responsabili, nonché dati al momento preliminari sugli esiti e sulla durata della gravidanza. Le informazioni ottenute hanno rilevanza particolare in quanto descrivono 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 e regimi di trattamento antiretrovirale.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto, in funzione della ampiezza sia della casistica che della quantità dei dati raccolti, è in grado di svolgere analisi che richiedono una consistente numerosità. Queste includono: lo studio delle relazioni fra terapia antiretrovirale e durata della gravidanza; lo studio degli esiti della gravidanza, con particolare riferimento ad abortività nelle segnalazioni prospettiche e alla sorveglianza sulle malformazioni, particolarmente per le donne con una gravidanza non pianificata insorta in corso di trattamento antiretrovirale; complicanze della gravidanza e del parto; definizione e frequenza di condizioni di rischio per la trasmissione verticale dell'infezione (modalità del parto, carica virale, terapia antiretrovirale); sicurezza generale del trattamento per la madre (tossicità in corso di gravidanza, con particolare riferimento all'impatto delle terapie antiretrovirali su metabolismo glucidico e lipidico) e per il neonato. Un sottostudio specifico affronta aspetti di farmacocinetica e virologia nella gestante HIV-positiva e nel neonato.

La durata del progetto è aperta, in quanto uno dei principali obiettivi del progetto è la sorveglianza sulla sicurezza in gravidanza dei farmaci anti-HIV di nuova introduzione. Sono inoltre previsti collegamenti fra database e scambio di dati con altri *network* collaboranti, da cui si ritiene di poter derivare 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 e efficacia;
- Allestimento di una rete significativa di collaborazioni nell'ambito della farmacovigilanza in gravidanza, nella gestione della gravidanza in donne con infezione da HIV, e nello studio degli effetti della terapia.

Promozione della sperimentazione clinica di fase I in Italia

La sperimentazione clinica di fase I, tappa limitante nel trasferimento della ricerca di base all'applicazione clinica di nuove terapie, per le sue finalità e modalità di esecuzione (studio approfondito di ciascun soggetto), presenta anche ricadute positive sulla formazione del farmacologo clinico e, più in generale, sulla cultura del farmaco nella classe medica.

La Commissione dell'Istituto che autorizza le sperimentazioni cliniche di fase I in Italia, ha ritenuto che il superamento di questo ritardo può avvenire solamente con l'impegno di tutte le parti coinvolte, in quanto nessuna di loro è in grado di risolverlo autonomamente a causa delle limitate capacità d'intervento su un problema così complesso. Si è così convenuto di avviare, nel prossimo triennio, un programma di consultazione con le altre parti sugli aspetti critici del problema, al fine di identificare le iniziative condivise che ciascuna di loro dovrà intraprendere per rilanciare la ricerca italiana in questo settore.

La revisione dell'attuale normativa per semplificare ulteriormente il processo globale di approvazione, è un passaggio indispensabile per soddisfare le dinamiche della ricerca in questo settore, senza interferire sugli aspetti scientifici del processo di valutazione. Il primo passo è già stato compiuto dalla Commissione con la predisposizione di una nuova bozza di regolamento per sostituire il DPR 439/2001, che è stata sottoposta all'attenzione del Ministro della Salute alla fine del 2004, ma che necessita di un aggiornamento.

La messa a punto di una nuova procedura operativa della Commissione per consentire il rispetto dei tempi previsti dalla normativa per la formulazione dei pareri, non è sufficiente senza la fattiva collaborazione degli esperti dei proponenti. Infatti, la quasi totalità dei numerosi ritardi nel completamento dell'istruttoria sono causati dalle frequenti interruzioni per acquisire chiarimenti o integrazioni della documentazione presentata. Occorre anche una adeguata informazione dei ricercatori italiani sulla possibilità di confrontarsi con gli esperti dell'Istituto per discutere la pianificazione dello sviluppo pre-clinico e degli protocolli clinici di fase I. Questa interazione può avere una ricaduta positiva per le eventuali consultazioni in ambito comunitario durante lo sviluppo successivo delle nuove terapie.

Un passaggio strategicamente importante è rappresentato dalla istituzione di nuovi centri clinici italiani (attualmente trascurabile) e dalla formazione di personale qualificato in grado di fare sperimentazioni cliniche di fase I. A questo fine, l'Università e gli IRCCS dovranno assumere un ruolo guida, per stimolare l'interesse dell'Industria e le iniziative dei ricercatori italiani. Si dovranno esaminare le modalità di collaborazione del personale dell'Istituto ai programmi universitari di formazione.

Il ruolo dell'industria è fondamentale in quanto sorgente delle proposte, e depositaria dell'esperienza, degli strumenti e delle risorse necessarie. Dovranno essere esaminati interventi

per consentire all'industria di valorizzare le risorse disponibili nei centri di ricerca clinica italiani, anche per stimolarne l'apertura di nuovi, e di collaborare nel facilitare il processo di valutazione. A questo fine, dovranno essere coinvolti altri dicasteri anche per studiare misure premianti per i prodotti sottoposti a sperimentazione clinica di fase I in Italia, ad esempio una defiscalizzazione dei costi e/o una *fast-track* per la registrazione.

La Commissione intende poi implementare tutte le iniziative fino ad ora intraprese dall'Istituto:

Il sito di consultazione dell'Istituto che riporta informazioni utili su aspetti generali (procedure, modalità di presentazione delle domande, ecc.) e più strettamente tecnici sulla documentazione (linee guida di riferimento).

Il programma di audizioni *pre-submission* per esaminare con i proponenti le strategie precliniche e i protocolli clinici

Il programma di consultazione con esperti su specifici argomenti

L'accesso diretto degli esperti per la valutazione di competenza al dossier immesso elettronicamente nella banca dati dell'AIFA

Simposi e Tavole Rotonde su argomenti specifici

Modalità di pubblicizzazione delle attività dell'Istituto

Pubblicazioni di monografie su argomenti di particolare rilevanza (linee guida)

Risultati attesi nel triennio

Nonostante l'Italia sia stata il primo Paese a regolamentare il processo di autorizzazione alla sperimentazione clinica nella metà degli anni '70, le sperimentazioni cliniche di fase I svolte nel nostro Paese, attualmente inferiore a quello degli altri Paesi industrializzati. Tuttavia, l'interesse dei ricercatori italiani è testimoniato dalla loro partecipazione a studi clinici di fase I con i farmaci innovativi, e dal crescente numero di proposte terapeutiche innovative, messe a punto nei loro laboratori anche con l'impiego di metodiche d'avanguardia. Occorre tener presente che, la sperimentazione clinica di fase I è meno attraente per il clinico rispetto a quelle di fase II, III e IV, poiché, a fronte del maggiore impegno richiesto, i risultati non hanno una ricaduta immediata in ambito terapeutico e raramente sono oggetto di pubblicazione.

L'attività descritta consentirà un aumento del numero di studi clinici di fase I in Italia, con un maggiore coinvolgimento dei ricercatori italiani in questi studi.

Le nuove strategie dovrebbero consentire una maggiore efficienza del processo globale di autorizzazione, mantenendo elevato il profilo scientifico della valutazione dei contenuti.

La realizzazione di questo progetto offrirà ai ricercatori italiani le stesse opportunità dei loro colleghi stranieri di avviare il processo di verifica in clinica di nuove proposte terapeutiche formulate in laboratorio

Trasferibilità dei risultati

La Commissione dovrà identificare le strategie per ottenere dallo Stato e dalle Regioni finanziamenti mirati a sostegno delle azioni proposte, e per predisporre strumenti premianti a supporto delle proposte spontanee dei ricercatori italiani che, come riportato in precedenza, mostrano un crescente interesse per gli studi di fase I.

Queste iniziative dovrebbero portare a creare le condizioni idonee per attivare un *network* di centri di ricerca nazionali accreditati, dove svolgere le sperimentazioni cliniche di fase I, e aumentare i laboratori di ricerca abilitati alla produzione in GMP di preparazioni biologiche innovative da sperimentare in queste sperimentazioni.

Qualità dei farmaci: verifica dell'applicabilità delle Linee Guida internazionali alle attività di controllo e valutazione svolte dal Dipartimento del Farmaco in qualità di laboratorio ufficiale di controllo nazionale

Scopo del progetto è il riesame e la valutazione critica delle Linee Guida europee relative all'attività di controllo chimico-analitico e all'attività valutativa svolte dal Dipartimento del Farmaco.

Per quanto attiene all'attività di controllo chimico-analitico che il Dipartimento svolge quale Laboratorio Ufficiale facente parte della rete europea degli OMCLs (*Official Medicinal Control Laboratories*), il riesame delle Linee Guida è iniziato verificando l'applicabilità e l'efficacia delle indicazioni europee in merito alla stima dell'incertezza di misura, mettendo a confronto quanto proposto dal *network* OMCL con quanto suggerito dalla più recente letteratura.

Per quanto concerne invece l'attività valutativa svolta dal Dipartimento, in particolare la valutazione della parte chimico-farmaceutica (parte IIB e Modulo 3) dei *Dossier* di autorizzazione all'immissione in commercio presentati dalle Ditte, il progetto prevede la verifica dell'applicabilità i) delle Linee Guida relative alla stabilità (quali la CPMP/CH/2736/99 e la CPMP/CH/280/95) e ii) delle Linee Guida relative alla definizione delle specifiche entro le quali i nuovi principi attivi e le nuove formulazioni farmaceutiche devono rientrare (tra queste ad esempio la CPMP/CH/367/96). Il progetto intende verificare su classi di farmaci ampiamente utilizzati quali antinfiammatori non steroidei e cardiovascolari, se i limiti fissati da tali Linee Guida sono troppo o troppo poco stringenti.

Infine il progetto prevede la raccolta, la classificazione e l'analisi statistica delle problematiche riscontrate nei *Dossier* di autorizzazione all'immissione in commercio esaminati dal Dipartimento.

Risultati attesi nel triennio

Favorire la conoscenza e l'applicazione delle Linee Guida attraverso ulteriori pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali e la produzione di documentazione di revisione e approfondimento tramite le modalità messe a disposizione dallo stesso ISS (rapporti ISTISAN ecc).

Rendere le Linee Guida più aderenti alle attività reali svolte dal Dipartimento del Farmaco in qualità di laboratorio ufficiale di controllo nazionale.

Evidenziare i punti critici emersi nella valutazione dei *Dossier* e le deviazioni più frequenti riscontrate rispetto ai requisiti delle Linee Guida.

Rendere il Dipartimento del Farmaco il Centro di *Expertise* nazionale sulla stima dell'incertezza di misura nell'attività di controllo in campo farmaceutico. Si prevede pertanto la prosecuzione degli studi intrapresi e già presentati alla comunità scientifica attraverso due comunicazioni a congressi e la pubblicazione di un rapporto Istisan; un secondo rapporto Istisan e un articolo proposto ad una rivista internazionale sono, infine, in via di pubblicazione.

Trasferibilità dei risultati

Partecipazione anche a livello propositivo al dibattito internazionale sulla stesura e revisione delle Linee Guida.

Qualità dei medicinali generici: valutazione della effettiva similarità tra prodotti generici e corrispondenti prodotti originatori

La valutazione della bioequivalenza tra un generico e il prodotto originatore di riferimento è indispensabile per confermare l'assenza di una differenza significativa nell'entità e nella velocità alle quali un principio attivo, contenuto in medicinali farmaceuticamente equivalenti, diviene disponibile nel sito d'azione se somministrato alla stessa dose molare e in condizioni simili.

Alcuni metodi *in vitro*, e in particolare la determinazione della velocità di dissoluzione, sono considerati potenziali modelli per predire il comportamento *in vivo*. Il principio attivo in una forma farmaceutica deve essere rilasciato e successivamente dissolversi nei fluidi biologici allo scopo di divenire disponibile nel sito d'azione all'interno dell'organismo umano. Di conseguenza, la velocità di dissoluzione è uno dei fattori che possono evidenziare differenze tra medicinali contenenti lo stesso principio attivo, somministrati nella stessa forma farmaceutica e allo stesso dosaggio.

L'obiettivo del progetto è la valutazione dell'effettiva similarità tra prodotti generici e relativi originatori attraverso studi *in vitro* e eventuali studi di correlazione *vivo-vitro*.

In una prima fase di attuazione del progetto si effettueranno studi di dissoluzione *in vitro* su classi di medicinali per i quali la non equivalenza terapeutica rispetto all'originatore potrebbe presentare i maggiori rischi per la salute. La scelta sarà effettuata sulla base della forma farmaceutica e delle caratteristiche chimico-fisiche del principio attivo (occorrenza di polimorfismo, scarsa solubilità o permeabilità) nei casi in cui la dissoluzione acquisti particolare rilevanza.

L'attenzione sarà rivolta in particolare a studi di dissoluzione su forme farmaceutiche a rilascio modificato di farmaci di largo uso o introdotti di recente sul mercato attraverso la procedura di mutuo riconoscimento, allo scopo di evidenziare possibili differenze di velocità di rilascio *in vitro* tra le varie formulazioni reperibili sul mercato nazionale. Eventuali differenze potrebbero riflettersi in una diversa biodisponibilità *in vivo* e quindi una diversa sicurezza e efficacia. Saranno inoltre oggetto di studio le caratteristiche tecnologiche di tali forme farmaceutiche in considerazione della rilevante e accertata influenza di queste sul rilascio del principio attivo e sul suo assorbimento.

Risultati attesi nel triennio

La possibile non equivalenza terapeutica di medicinali generici influisce sulla sicurezza e efficacia dei medicinali, in particolare di quelli che contengono principi attivi a basso indice terapeutico e sono commercializzati in forme farmaceutiche non convenzionali (p.es. farmaci cardioattivi in forme farmaceutiche a rilascio modificato).

Il presente progetto si propone pertanto i seguenti obiettivi :

mettere a punto strategie analitiche, in particolare sviluppare metodi di dissoluzione atti a discriminare fra formulazioni uguali o simili;

verificare l'effettiva similarità e eventualmente la bioequivalenza generico/originatore;

favorire la conoscenza e l'applicazione delle linee guida (per es. CPMP/EWP/QWP/1401/98, CPMP/QWP/604/96);

creare un centro di riferimento regolatorio per la valutazione di problematiche complesse relative alla similarità farmaco generico/originatore eventualmente mediante messa a punto e convalida di saggi *in vitro* in particolare test di dissoluzione.

Trasferibilità dei risultati

Il mercato dei generici è ancora assai limitato in Italia infatti la diffusione si attesta intorno al 3.3% mentre in altri Paesi europei raggiunge valori ben più elevati (48% Olanda, 39% Regno Unito, 33% Germania). Molti medici, infatti, temono differenze di qualità e efficacia tra il farmaco originatore e il corrispondente generico. Tale atteggiamento di diffidenza si ripercuote ovviamente anche sui pazienti e fa sì che non sia la convenienza, bensì la fiducia nel medico prescrittore, il principale fattore che influisce sull'accettazione dei generici da parte dei pazienti. Appare pertanto indispensabile un maggior controllo della qualità, e quindi della sicurezza e efficacia dei prodotti in commercio.

Gli studi effettuati consentiranno:

- verifica/aggiornamento della lista di riferimento dei medicinali non coperti da brevetto, intercambiabili e soggetti al regime del prezzo di rimborso pubblicata dal Ministero della Salute (Legge 16 novembre 2001, n. 405);
- impatto positivo sulla fiducia del cittadino nel medicinale generico;
- contenimento reale della spesa sanitaria.

Recettori A2A dell'adenosina e mGlu5 del glutammato come possibili target per il trattamento di patologie neurodegenerative

Il progetto si propone il raggiungimento dei seguenti obiettivi specifici:

Obiettivo 1: Studio dell'influenza di ligandi dei recettori mGlu5 del glutammato nella modulazione del tono motorio in condizioni fisiologiche e in un modello di morbo di Parkinson.

Questi studi consentiranno di verificare innanzi tutto se i recettori mGlu5 contribuiscono alla regolazione della motilità spontanea in maniera analoga ai recettori A2A. Successivamente si verificherà se agonisti di tali recettori modulano selettivamente le caratteristiche di legame dei recettori D2 in membrane striatali e gli effetti motori D2-dipendenti in un modello di morbo di Parkinson, se gli effetti di agonisti mGlu5 coinvolgono anche i recettori A2A e infine se antagonisti mGlu5 possono costituire dei possibili farmaci antiparkinson.

Obiettivo 2: Studio del meccanismo d'azione degli effetti neuroprotettivi di antagonisti A2A.

Questi studi si propongono di verificare se i suddetti effetti neuroprotettivi siano attribuibili ad un'azione pre- e/o postsinaptica a livello dello striato, di studiare il possibile coinvolgimento di fenomeni infiammatori e di chiarire se esiste o meno una specificità regionale (confronto degli effetti di antagonisti A2A in modelli di eccitotossicità striatale e ippocampale).

Obiettivo 3: Studio dei possibili effetti neuroprotettivi di antagonisti mGlu5 in modelli di patologie neurodegenerative

Per questi studi, che potrebbero contribuire al chiarimento dei complessi e contrastanti effetti esercitati da ligandi dei recettori mGlu I in modelli di neurodegenerazione, saranno utilizzati i modelli di eccitotossicità striatale e ippocampale caratterizzati nell'ambito dell'obiettivo precedente.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione dei meccanismi responsabili dell'interazione funzionale tra recettori A2A e mGlu5 a livello striatale.

Caratterizzazione degli effetti di antagonisti dei recettori A2A e mGlu5, da soli e in combinazione, nei modelli di eccitotossicità messi a punto nel corso del primo anno.

Definizione del meccanismo responsabile degli effetti neuroprotettivi degli antagonisti A2A (studio degli effetti presinaptici, postsinaptici e sui meccanismi infiammatori).

Studio di eventuali alterazioni funzionali e di modifiche dell'espressione dei recettori mGlu5 nel corso dell'invecchiamento.

Trasferibilità dei risultati

Riduzione dei tempi di attraversamento del processo di assessment delle procedure di mutuo riconoscimento

Dall'analisi dell'esperienza maturata emerge che il tempo impiegato per la valutazione delle procedure di mutuo riconoscimento da parte degli esperti ISS per conto dell'AIFA, è utilizzato in gran parte per analizzare problematiche che presentano elementi di sovrapposizione con il lavoro svolto in precedenza (stesso principio attivo, stessa forma farmaceutica, stesso produttore ecc.). Spesso la valutazione tecnica della documentazione viene effettuata senza tener conto di quanto precedentemente svolto. È necessario quindi mettere a fattor comune (*knowledge-sharing*)

l'esperienza maturata su prodotti simili. Tale obiettivo potrebbe essere raggiunto attraverso un progetto che preveda l'acquisizione dei pareri espressi sulle documentazioni riguardanti i principi attivi e i prodotti finiti in fase di autorizzazione e la loro catalogazione. Un altro fattore importante è che gli esperti abbiano a disposizione in modo razionale e rapido tutte le linee guida internazionali, quali strumenti indispensabili per una corretta valutazione.

Risultati attesi nel triennio

Redazione e archiviazione di *assessment* dei *Drug Master File* (DMF).

Archiviazione dei commenti espressi dagli esperti ISS e dagli altri paesi europei sulle procedure di mutuo riconoscimento.

Creazione di un *repository* per le linee guida internazionali e per tutti i documenti collegati.

Creazione di uno strumento (*software*) che consenta la ricerca degli argomenti e la tracciabilità delle informazioni utilizzate per la valutazione.

Elaborazioni statistiche dei risultati.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo di tale sistema permetterà agli esperti impegnati nella valutazione un risparmio in termini di tempo, a salvaguardia di tutte le altre attività previste dallo statuto dell'ISS. Inoltre consentirà di uniformare l'attività e di quindi migliorare la qualità del prodotto (*assessment*) fornito all'autorità competente (AIFA).

I risultati prodotti saranno oggetto di pubblicazione (rapporti di Istituto o pubblicazioni su riviste).

Role of environmental factors in tumor immune escape: proton pumps and acidity

The release of subcellular organelles (including exosomes) in physiological and pathologic conditions is presently an object of interest. These structures, produced through an active process, express tetraspanin family proteins, HLA molecules, heat shock proteins, ezrin, and other proteins involved in cytoskeleton function. Although MV secretion could be physiological in normal tissues, this phenomenon seems to be greatly exacerbated in tumor cells, as suggested by the constitutive MV release reproducibly observed in tumor cells. Tumor cells may thereby locally and systemically influence the host environment through a broad array of modulating signals delivered by secreted MV. These lysosome-derived organelles, characterized by a 50–100-nm diameter and a high content of cytosolic and membrane proteins derived from the producing cell, are released by tumor cells *in vitro* and are found in plasma and tumor specimens from patients with advanced cancers of different histologies. Preliminary results of our group suggest that tumor microenvironment may have a role in modulating the MV release by the tumor cells. It seems that alkalinization of tumor microenvironment may lead to clear inhibition of exosome release and acidic vesicle traffic within tumor cells. Thus, in this study we will investigate how much the acidic condition of a tumor may influence the anti-tumor immune response in terms of efficacy of the response *in vitro* and the level of delivery of human anti-tumor lymphocytes to the autologous tumors in SCID mice/human tumor models. We also will investigate whether treatment with proton pump inhibitors (PPIs) may induce increase the sensibility of tumor cells to antigen-specific cytotoxic T cells.

Risultati attesi nel triennio

We hope to show that at least one important mechanism of tumor escape from the immune response involves tumor acidity. This evidence has to pass through a series of *in vitro* and *in vivo* breakthroughs based on the evidence that malignant tumor cells create an acidic microenvironment in turn due to the continuous activation of proton pumps that operate to avoid acidification of the tumor cell cytosol.

The most important results that can be expected in our study are detailed as follows:

To show that pH ranging from 6 to 5 induce apoptosis of activated and/or antigen-specific T lymphocyte.

To show that in these conditions treatment with proton pump inhibitors (PPI) may induce a better viability and function of tumor-specific CTL in co-cultivation with autologous tumor cells.

To show in vivo, in SCID mice with human tumors, through Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, that the tumors are variably acidic and that treatment with PPI induces increase of tumor pH. Using the same technique we want to show that the tumors contain areas with different pH.

To show that pretreating with oral administration of PPI SCID mice with human tumors, tumors become more sensible of treatment with autologous antigen-specific CTL.

To show that in tumor patients with primary and/or metastatic melanoma treatment with PPI may lead to an increase in the tumor infiltrating lymphocytes, possibly corresponding to the necrotic areas.

Trasferibilità dei risultati

The goal of this study is to provide a new approach for adoptive immunotherapy of tumors. This approach includes the reduction of an important mechanism of tumor immune escape such as the release of acidic microvesicles that express killer molecules, particularly active against T lymphocytes.

Ruolo degli endocannabinoidi nella regolazione della funzionalità striatale in modelli sperimentali di corea di Huntington

I recettori CB1 dei cannabinoidi sono particolarmente concentrati a livello dei gangli della base, una regione coinvolta nella regolazione del tono motorio e dei processi cognitivi. I cannabinoidi endogeni (o endocannabinoidi) interagiscono con i due principali sistemi di neurotrasmissione dello striato, e cioè il sistema dopaminergico e il sistema glutammatergico. Dato che il normale tono motorio dipende dal funzionamento bilanciato di tali sistemi di neurotrasmissione, mentre un loro sbilanciamento è alla base dei disordini del movimento che accompagnano le malattie neurogenerative dello striato (morbo di Parkinson e corea di Huntington), farmaci attivi sui recettori degli endocannabinoidi potrebbero essere in grado di modulare il tono motorio in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Il sistema degli endocannabinoidi potrebbe inoltre essere coinvolto nella patogenesi della corea di Huntington. È stato infatti osservato che, nello striato di pazienti affetti da corea o di topi transgenici per la malattia, si osserva una netta riduzione dell'espressione di recettori CB1 in fasi che precedono la perdita neuronale.

Questo progetto si propone di contribuire al chiarimento del ruolo dei cannabinoidi nella regolazione della funzionalità striatale in condizioni fisiologiche e in modelli sperimentali di corea di Huntington. A tal fine saranno utilizzati modelli sperimentali animali (lesione dello striato dorsale di ratto da eccitotossine o da tossine mitocondriali, utilizzo di topi transgenici R6/2), tissutali (*slices* corticostriatali di ratto) e cellulari (colture primarie di striato).

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto consentirà di stabilire se il trattamento con farmaci attivi sui recettori CB1 esercita effetti benefici in modelli sperimentali di corea di Huntington. esso consentirà inoltre di chiarire il meccanismo dell'azione neuroprotettiva dei cannabinoidi.

Trasferibilità dei risultati

Trattandosi di un progetto di ricerca di base, è difficile prevedere la reale trasferibilità dei risultati. Qualora tuttavia il progetto dovesse dimostrare che farmaci attivi sui recettori CB1

sono effettivamente in grado di contrastare/rallentare il progetto neurodegenerativo in modelli sperimentali, questi risultati potrebbero porre le basi per il trattamento farmacologico di una malattia attualmente incurabile.

Ruolo dei recettori A2A dell'adenosina e metabotropici del glutammato nelle demenze da neurodegenerazione striatale

Obiettivo 1. Studio di possibili alterazioni dell'espressione e della funzionalità dei recettori A2A e mGlu (fase 1), e successivamente dei possibili effetti neuroprotettivi di farmaci che ne modulino selettivamente la funzione (fase 2), in modelli sperimentali di neurodegenerazione striatale indotta "acutamente" da meccanismi eccitotossici (iniezione intrastrinatale di acido chinolinico nel ratto; applicazione di acido chinolinico a cellule striatali in coltura) e da tossicità mitocondriale (applicazione di acido 3-nitropropionico a slices corticostriatali e a cellule striatali).

Dal momento che l'obiettivo principale di un intervento neuroprotettivo è quello di prevenire l'esordio e/o ritardare la progressione clinica di una malattia, sarà necessario verificare che le strategie eventualmente identificate nel corso delle fasi 1 e 2 siano effettivamente in grado di influenzare lo sviluppo di una neurodegenerazione e quindi l'espressione clinica della demenza.

Obiettivo 2 del progetto è appunto quello di studiare il possibile ruolo dei recettori A2A e mGlu in modelli sperimentali di neurodegenerazione striatale progressiva nei quali sia possibile studiare l'evoluzione temporale del danno neurodegenerativo in relazione allo sviluppo e alla progressione del *deficit* cognitivo. Il modello prescelto, che è caratterizzato da marcata neurodegenerazione striatale associata allo sviluppo di alterazioni cognitive e di un fenotipo neurologico progressivo, e che è quindi molto rappresentativo delle patologie neurodegenerative accompagnate da demenza sottocorticale, è quello degli animali che presentano la mutazione responsabile della corea di Huntington (topi transgenici). In tale modello, che sarà utilizzato come "tracciante" per lo studio delle demenze sottocorticali, si ricercheranno eventuali indicatori diagnostici precoci che consentano di intervenire prima della manifestazione conclamata della demenza, e si valuteranno gli effetti del trattamento con ligandi selettivi dei recettori allo studio.

Risultati attesi nel triennio

Definizione del possibile ruolo dei recettori allo studio nella patogenesi del danno striatale e del conseguente deficit cognitivo-comportamentale. Ciò potrebbe costituire la base di partenza per lo sviluppo di strategie terapeutiche neuroprotettive da applicare non soltanto alle demenze sottocorticali (morbo di Parkinson, corea di Huntington, paralisi sopranucleare progressiva, demenza da HIV), ma anche a tutte le altre sindromi neurologiche che, indipendentemente dall'eziologia, sono sostenute da meccanismi patogenetici quali eccitotossicità, *deficit* energetico e *stress* ossidativo.

Caratterizzazione delle fasi precliniche con eventuale identificazione di *marker* precoci di malattia. Messa a punto di nuovi modelli cellulari per lo studio dei meccanismi molecolari responsabili delle demenze da neurodegenerazione striatale e per la verifica dell'efficacia di interventi terapeutici.

Ruolo della leptina nella modulazione del sistema immunitario in risposta ad agenti infettivi e nell'insorgenza di patologie autoimmuni

La sindrome metabolica che comprende obesità e iperinsulinemia associata ad insulino resistenza, rappresenta un fattore di rischio nello sviluppo di malattie cardiovascolari. La leptina, un ormone/citochina coinvolta nella regolazione immunitaria, rappresenta un marcatore di suscettibilità per queste patologie. I livelli plasmatici di leptina sono più elevati nelle donne

rispetto agli uomini e questo si associa ad una maggiore frequenza di patologie cardiovascolari e autoimmuni nelle donne. È stato dimostrato che elevati livelli di leptina favoriscano la rottura della tolleranza verso il *self* e promuovano patologie autoimmuni T CD4+-mediate. Recentemente, abbiamo dimostrato che leptina attiva le cellule dendritiche (DC). Sulla base di queste premesse ci proponiamo di:

definire il ruolo della leptina nella patogenesi delle malattie autoimmuni associate a patologie cardiovascolari. In particolare, verrà valutato se elevati livelli di leptina possano concorrere alla rottura della tolleranza verso il *self* mediato dalle DC, causando l'attivazione e proliferazione di cloni T autoreattivi. Verrà, valutato il coinvolgimento della leptina nelle interazioni DC-cellule T regolatorie.

approfondire gli studi gli effetti della leptina sulle DC valutando gli effetti sulla loro mobilità e capacità migratorie al fine di un possibile impiego della leptina come adiuvante nei protocolli di vaccinazione e nello sviluppo di vaccini basati sull'uso delle DC.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio è finalizzato a definire le modalità con le quali la leptina agisce da un parte da immunostimolante utile nel combattere le infezioni e, dall'altra il suo coinvolgimento nelle patologie autoimmuni. In particolare, ci proponiamo di valutare se questi effetti possano in parte essere mediati dall'azione della leptina sulle DC. Abbiamo infatti recentemente dimostrato che le DC esprimono in superficie il recettore per la leptina OB-Rb capace di indurre segnali intracellulari. Abbiamo inoltre dimostrato come la leptina, in dosi paragonabili ai livelli sierici in condizioni normali, influisce sullo stato funzionale e morfologico delle DC *in vitro*, favorendone la funzione presentante e la capacità di polarizzare la risposta immune verso Th1. Inoltre la modulazione, da parte della leptina, delle citochine prodotte dalle DC, può sostenere l'attivazione delle cellule responsabili dell'immunità innata e adattativa. Questi risultati appoggiano l'ipotesi di un uso farmacologico-immunoterapeutico della leptina e il suo possibile uso come adiuvante nei protocolli di vaccinazione basati sull'uso di DC.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio proposto, potranno contribuire a chiarire i meccanismi d'azione della leptina e potrebbero favorire un approccio terapeutico basato sulla somministrazione di antagonisti della leptina in modo da ristabilire un equilibrio tra gli effetti immunostimolanti protettivi e gli effetti patologici della leptina. Quindi la modulazione della produzione di leptina attraverso un approccio nutrizionale e farmacologico potrebbe avere una potenziale utilità nel trattamento delle malattie autoimmuni da un lato e nel combattere le infezioni dall'altra. Se questo sarà possibile soltanto studi approfonditi in campo immunologico potranno dirlo.

Ruolo della P-glicoproteina e di altri meccanismi cellulari di trasporto nella resistenza di HIV agli inibitori delle proteasi (PI's)

La possibilità di interferire con il meccanismo di azione dei meccanismi di trasporto dei farmaci (MTF) per aumentare l'efficacia della farmacoterapia anti HIV è strettamente legata alla conoscenza strutturale e funzionale (questi aspetti sono fra loro interconnessi) della P-glicoproteina e MRP. Questo studio è possibile attraverso l'utilizzo di sistemi cellulari *in vitro* e in particolare dall'analisi degli MTF presenti in varianti MDR di cellule tumorali. Infatti, è stato inequivocabilmente dimostrato che la P-glicoproteina media l'efflusso degli PI's Saquinavir, Ritonavir e Indinavir (PIs) contro un gradiente di concentrazione riducendone la biodisponibilità cellulare. Per verificare il ruolo e la rilevanza farmacologica degli MTF ci siamo posti come obiettivo di studiare se: a) la P-glicoproteina espressa nelle varie popolazioni linfocitarie possa essere considerata simile a livello strutturale e funzionale con quella indotta in sistemi *in vitro* mediante composti citotossici; b) i reagenti utilizzati per determinare l'espressione e le funzioni

di trasporto della P-glicoproteina presente nei linfociti siano adeguati; c) gli PIs siano efficientemente e in egual misura trasportati anche dalla P-glicoproteina presente nei linfociti; d) l'impegno della P-glicoproteina da parte degli PIs può alterare il quadro dei mediatori della risposta immune

Risultati attesi nel triennio

Sebbene il ruolo della P-glicoproteina nella farmacologia combinata di PI's per combattere l'infezione da HIV rimanga da stabilire in modo inequivocabile, i dati finora ottenuti *in vitro*, e in studi preclinici e clinici sono sufficientemente consistenti per verificare la fattibilità di cure farmacologiche basate sulla modulazione degli MTF. I presupposti scientifici di tali terapie coincidono con gli obiettivi e i risultati intendiamo perseguire e ottenere in un arco di tempo triennale. Questi includono una più approfondita conoscenza dei meccanismi di azione della P-glicoproteina in rapporto alla sua distribuzione nei tessuti e nelle cellule coinvolte nell'assorbimento nella penetrabilità degli PI's. Inoltre intendiamo determinare la capacità di ciascun singolo PI's incluso nella terapia HAART di essere riconosciuto e trasportato dalle varie isoforme di P-glicoproteina presenti nelle sottopopolazioni linfocitarie bersaglio dell'infezione di HIV. Ciò consentirà di identificare quali fra i diversi inibitori della funzione della P-glicoproteina (inclusi anticorpi monoclonali specifici anche in forma scFv) possono essere somministrati in combinazione con gli PI's per aumentarne gli effetti antivirali senza produrre effetti tossici avversi

Trasferibilità dei risultati

Modulazione della P-glicoproteina attraverso l' utilizzo di anticorpi monoclonali umani in forma scFv per aumentare la biodisponibilità dei farmaci antivirali. Ciò consentirebbe di aumentare l'efficacia delle terapie anti HIV diminuendone gli effetti avversi.

Ruolo dell'acidità nei tumori umani

Il problema della resistenza ai farmaci citotossici è un problema centrale nella lotta contro i tumori. Un potenziale meccanismo di resistenza può essere l'esistenza di un ambiente acido nel tumore (1-3), che non consente ad un farmaco di entrarvi. Si sa infatti che un gradiente di pH fra l'esterno e l'interno della cellula è elemento essenziale per il passaggio del farmaco. La gran parte dei chemioterapici sono basi deboli, quindi l'acidità tumorale può di per se neutralizzare il farmaco. I meccanismi coinvolti nell'acidificazione sono la produzione di acido lattico dovuta alla necrosi tumorale e l'elevata espressione e attività di pompe ioniche. Abbiamo dimostrato che il pre-trattamento di cellule resistenti a gran parte dei farmaci anti-tumorali con farmaci capaci di inibire pompe ioniche, e finora usati come anti-acidi (e.g. omeprazolo), rende le cellule sensibili alla terapia. In questo progetto saranno studiati i possibili meccanismi correlati alla acidificazione tumorale, incluse una serie di pompe a scambio ionico non completamente conosciute. Inoltre, saranno studiati i meccanismi specifici legati all'effetto degli inibitori delle pompe protoniche sulle cellule tumorali. In particolare verranno studiati i siti di interazione degli inibitori delle pompe protoniche (PPI) sulle cellule tumorali (per esempio, le ATPasi vacuolari). Verranno infine studiati, *in vitro* e *in vivo*, gli effetti dei cambiamenti di pH sulla omeostasi e sulla crescita tumorale. Il traffico delle vescicole acide verrà approfonditamente studiato, con particolare riguardo al rilascio delle vescicole acide nell'ambiente extracellulare.

1) Luciani F, et al. J Natl Cancer Inst. 2004 96:1702.

2) De Milito A, FAIS S. Exp Opin Pharmacot 2005;6:1049.

3) Gateno RA, Gillies RJ. Nat Rev Cancer. 2004 4:891

Risultati attesi nel triennio

Si ritiene di poter ottenere risultati che dimostrino che l'acidità tumorale è uno dei meccanismi chiave della malignità. Più schematicamente ci si attende di poter dimostrare che:

Nelle cellule tumorali maligne e con attività metastatica vengono attivati meccanismi capaci di creare un ambiente acido.

Gli stessi meccanismi consentono alle cellule tumorali di sopravvivere in ambiente acido e privo di nutrienti.

Lo sviluppo di tali meccanismi può rappresentare un fenomeno epigenetico, cioè presente nella vita embrionale e nei tumori, ma non nei tessuti adulti sani.

Alcuni meccanismi cellulari già da noi descritti quali il cannibalismo e la produzione di microvescicole *killer* dipendano dall'acidità tumorale.

Le cellule tumorali maligne somigliano più a microorganismi in lotta per la sopravvivenza che a cellule facenti parte di un organismo complesso quale il corpo umano.

L'inibizione dei meccanismi di acidificazione, attraverso i PPI porti a una profonda alterazione del funzionamento della cellule a tumorale, sino all'arresto della proliferazione e alla morte cellulare.

I PPI abbiano un *target* cellulare diverso dalle ATPasi vacuolari gastriche e che la loro attivazione nell'ambiente tumorale avvenga con meccanismi diversi.

L'importanza dell'acidità tumorale sia maggiore nei tumori solidi di origine carcinomatosa o nei melanomi, rispetto ai tumori del sistema emolinfopoietico.

Si riesca a misurare il pH dei tumori *in vivo*, in modelli xenochimerici, attraverso metodiche di spettrofotometriche associate a risonanza magnetica nucleare.

Si riesca a dimostrare che l'inibizione dell'acidità tumorale correli con l'inibizione della crescita tumorale. a determinate dosi e tempi di trattamento.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio introdurrà la terapia anti-acida a base di inibitori delle pompe nella terapia dei tumori umani, in particolare dei tumori solidi che hanno mostrato scarsa sensibilità alle terapie correnti.

Inoltre, i risultati di questo studio forniranno elementi per introdurre nuove metodiche basate sulla risonanza magnetica nucleare per il rilevamento *in vivo* del pH tumorale, con lo scopo di verificare prima del trattamento il pH tumorale e se in seguito al trattamento il pH cambia.

Sintesi di agenti di contrasto per MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) per la diagnostica *in vivo* di malattie neurologiche degenerative

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili costituiscono un gruppo di rari disordini neurodegenerativi. Si ritiene che queste malattie siano causate dalla formazione nel cervello di proteine anomale, prioni (PrP-res), caratterizzate da un *fold*ing anormale che le rende altamente resistenti all'azione delle proteasi. I PrP-res alterano la conformazione delle proteine con cui entrano in contatto inducendo la formazione di placche nel cervello e distruzione della struttura neuronale. Attualmente la diagnosi della malattia avviene con esami autoptici *post mortem*, non esistono infatti *marker* periferici o mezzi che consentano una diagnosi *in vivo*. L'utilizzo di tecniche potenti quali la Risonanza Magnetica Nucleare ad Immagini (MRI) per la diagnostica *in vivo* è legato allo sviluppo di mezzi di contrasto che potenzino la risposta strumentale. Gli agenti sinora utilizzati nella MRI sono basati su sali o complessi del gadolinio, altamente polari, che purtroppo nel caso di malattie cerebrali non assicurano una risposta efficace a causa della loro scarsa capacità di passare la barriera ematoencefalica. Argomenti della nostra ricerca sono: 1) la progettazione e la sintesi di composti *carrier* con caratteristiche di lipofilia tali da migliorare il passaggio del gadolinio nel cervello; 2) la progettazione e la sintesi di composti fluorurati che abbiano la capacità di depositarsi *in vivo* sulle placche prioniche cerebrali rendendo possibile un'analisi MRI di fluoro.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca si propone di ottenere, per sintesi chimica, composti atti a rivelare *in vivo* tramite MRI, la presenza di depositi proteici propri della malattia prionica.

Saranno investigate due tipologie di agenti di contrasto:

1) Ligandi del gadolinio contenenti un *core* lipofilo adatto al passaggio della barriera ematoencefalica e all'interazione con le placche prioniche.

2) Ligandi contenenti dei gruppi fluorurati. La presenza di atomi di fluoro conferisce vantaggiose caratteristiche alla molecola quali un aumento di lipofilia, un aumento dell'intensità di fluorescenza, qualora sia presente, e infine la possibilità di utilizzare il *probe* fluorosostituito come mezzo di contrasto per la MRI. La preparazione di composti con questi requisiti strutturali e con affinità per le proteine delle placche, costituisce un interessante traguardo nonché il punto di partenza per uno studio di diagnostica *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

I composti sintetizzati saranno utilizzati da gruppi di ricerca del Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze dell'Istituto, per studi di diagnostica *in vitro* e *in vivo*.

I risultati della ricerca saranno oggetto di pubblicazioni e comunicazioni a congresso.

Studi sull'attività cannibalica dei tumori umani. Possibile ruolo nell'evasione tumorale e approcci terapeutici innovativi

Questo meccanismo potrebbe contribuire all'instaurarsi di profonde alterazioni a carico della risposta immune nei confronti di antigeni tumorali, e di conseguenza, alla genesi del fenomeno definito "*tumor immune escape*". Un'altra importante considerazione per gli obiettivi di questo studio, è che l'attività fagocitica sembra fortemente condizionata dall'attività citoscheletrica. È quindi verosimile che una profonda alterazione dell'attività citoscheletrica sia alla base dell'attività fagocitica aberrante presente nelle cellule tumorali. Quindi l'obiettivo principale del progetto è quello di definire con la massima accuratezza il/i meccanismo/i che sono alla base del cannibalismo delle cellule tumorali umane e stabilire l'importanza di tale fenomeno nell'evasione tumorale. Più in particolare, questo progetto si propone di valutare in cellule di tumori umani: 1) L'attività fagocitica spontanea; 2) L'espressione e la distribuzione di antigeni associati a lisosomi e fagosomi; 3) La capacità di fagocitare materiale inerte, cellule apoptotiche, lieviti e cellule vive; 4) La capacità di processare e presentare antigeni espressi in nuclei apoptotici e Candida A.; 5) La presenza di ezrina, radixina, moesina e di actina sulla membrana di organuli simil-lisosomali; 6) L'effetto di sostanze inibenti il citoscheletro actinico (citocalasine, trunculina, tossine batteriche) e di oligonucleotidi antisense per ezrina, radixina e moesina sulla attività fagocitica nei confronti di bilie di plastica, nuclei apoptotici, lieviti e cellule vive; 7) Lo studio del ruolo dell'attività lisosomale dei melanosomi nella resistenza multipla ai farmaci, associato o non alla espressione di P-glicoproteina, presente spontaneamente nelle cellule di melanoma.

Risultati attesi nel triennio

Successivamente, sarà stabilita l'importanza di tale attività fagocitica nel cannibalismo tumorale e le possibili correlazioni di tale attività con la attività del citoscheletro delle cellule tumorali. In particolare, ci si aspetta di verificare se il traffico intracellulare dei melanosomi/lisosomi di cellule di melanoma necessita di una connessione specifica delle membrane di questi organuli con il citoscheletro di actina. Sarà possibile inoltre valutare se tale comportamento aberrante delle cellule tumorali possa avere qualche correlazione con modificazioni delle proteine che regolano l'attività dell'actina e la sua connessione con le membrane cellulari.

Trasferibilità dei risultati

Si ritiene che il cannibalismo tumorale sia uno dei principali meccanismi che consentono ai tumori di sopravvivere in condizioni di estrema ostilità quali quelle che si creano durante la crescita tumorale. In particolare il cannibalismo può consentire a un tumore di cibarsi di altre cellule in condizioni di scarso o nullo apporto trofico attraverso il sangue. La conoscenza di questo meccanismo in tutti i suoi aspetti potrà consentire di approntare nuove terapie allo scopo, non di genericamente affamare le cellule, ma di privare le cellule tumorali dei meccanismi che consentono loro di cibarsi di altre cellule e quindi di sopravvivere anche in assenza di nutrienti ematici.

Studio clinico di fase 2 sulla efficacia del pre-trattamento con inibitori delle pompe protoniche in pazienti con osteosarcoma sottoposti a poli-chemioterapia

Il problema della resistenza ai farmaci citotossici è un problema centrale nella lotta contro i tumori. Infatti, vi sono alcuni tumori nei quali la chemioterapia può dimostrarsi efficace nelle fasi iniziali del trattamento divenendo poi totalmente inefficace. Alcuni studi pre-clinici hanno dimostrato l'importanza di proteine legate a pompe di efflusso che sarebbero in grado di espellere il farmaco fuori dalla cellula. La reale importanza di questi meccanismi nei fenomeni di resistenza ai farmaci presenti nei pazienti non è stata ancora del tutto dimostrata. Un potenziale meccanismo di resistenza può essere invece l'esistenza di un ambiente acido nel tumore (1-3), che non consente ad un farmaco di entrarvi. Si sa infatti che un gradiente di pH fra l'esterno e l'interno della cellula è elemento essenziale per il passaggio del farmaco. La gran parte dei chemioterapici sono basi deboli, quindi l'acidità tumorale può di per se neutralizzare il farmaco. I meccanismi coinvolti nell'acidificazione sono la produzione di acido lattico dovuta alla necrosi tumorale e l'elevata espressione e attività di pompe ioniche. Abbiamo dimostrato che il pre-trattamento di cellule resistenti a gran parte dei farmaci anti-tumorali con farmaci capaci di inibire pompe ioniche, e finora usati come anti-acidi (e.g. omeprazolo), rende le cellule sensibili alla terapia. Gli osteosarcomi sia dell'adulto che del bambino sono tumori rari, ma purtroppo fra i più frequenti nell'età pediatrica. Questo tipo di tumore sviluppa farmacoresistenza ad una combinazione di cisplatino, metotrexate, adriamicina e ifosfamide, che porta spesso all'insuccesso della terapia. Inoltre, vi è il problema degli effetti tossici sistemici. Nei pazienti con osteosarcoma vi è quindi un vuoto terapeutico e una esigenza di livelli più bassi di tossicità.

- 1) Luciani F, et al. J Natl Cancer Inst. 2004 96:1702.
- 2) De Milito A, FAIS S. Exp Opin Pharmacot 20056:1049.
- 3) Gatenby RA, Gillies RJ. Nat Rev Cancer. 2004 4:891

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo posto è quello di incrementare la percentuale di pazienti che presentano una buona risposta istologica ad un trattamento chemioterapico primario con cisplatino metotrexate, adriamicina e ifosfamide. Il trattamento dell'osteosarcoma prevede una fase di chemioterapia primaria cui segue la chirurgia della lesione primitiva. Successivamente alla rimozione della lesione il paziente viene sottoposto a chemioterapia post operatoria. Una delle principali motivazioni per l'uso di chemioterapia primaria nell'osteosarcoma è dovuta alla possibilità di valutare mediante esame istologico sul pezzo di resezione la necrosi tumorale chemioindotta, espressione della chemiosensibilità del tumore ai farmaci. Nei centri clinici coinvolti nello studio la risposta istologica viene valutata in termini di percentuale di cellule tumorali necrotiche. Gli studi già effettuati mostrano che la percentuale di pazienti che presentano una buona risposta istologica a cisplatino metotrexate, adriamicina e ifosfamide è del 50%. Quindi, l'obiettivo primario sarà di superare la percentuale di pazienti con risposta istologica alla

combinazione dei 4 farmaci. Obiettivo secondario dello studio sarà quello di valutare se un pretrattamento con inibitori della pompa protonica possa essere in grado di ridurre la tossicità midollare del trattamento chemioterapico.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio clinico proposto è da considerarsi il primo al livello mondiale sull'uso degli inibitori delle pompe protoniche nella terapia della farmacoresistenza tumorale, in particolare in una malattia, l'osteosarcoma che è orfana di terapia curativa specifica.

Questo studio pone il problema dell'acidità tumorale come un fatto centrale nella lotta contro il cancro. Inoltre l'uso dei PPI può ridurre le dosi di chemioterapici nel trattamento di pazienti già responsivi, riducendo a sua volta gli effetti tossici sistemici della chemioterapia. È importante sottolineare che tale valutazione sarà effettuata mediante l'utilizzo di un farmaco (omeprazolo) di largo utilizzo per altre indicazioni, quali le malattie peptiche, il cui profilo di tossicità e tollerabilità è ben noto. Inoltre, la modalità di utilizzo del farmaco oggetto della sperimentazione non va a modificare il routinario uso dei farmaci chemioterapici e quindi non pone i soliti problemi etici della terapia anti-tumorale.

In caso di esito positivo della sperimentazione noi avremmo la conferma che un farmaco largamente disponibile, maneggevole e sicuro possa modificare la resistenza ai chemioterapici in pazienti con tumore e diminuire gli effetti tossici sistemici della terapia anti-tumorale.

Studio degli effetti dell'assunzione di amminoacidi a catena ramificata in un modello sperimentale di sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una gravissima malattia neurologica dalla durata media di circa due-tre anni, caratterizzata, dal punto vista anatomico-patologico, da degenerazione della via piramidale e dei motoneuroni somatici del midollo spinale e bulbo e, clinicamente, da fascicolazioni, atrofia muscolare ingravescente, paraparesi spastica, disartria, difficoltà a masticare e deglutire, disturbi respiratori e sincope cardiaca. Recentemente è stato messo in evidenza un rischio di mortalità per SLA dodici volte superiore tra i 24.000 calciatori professionisti italiani rispetto alla popolazione generale. Una nuova ipotesi è stata quindi formulata, sulla base delle recenti evidenze scientifiche che mettono in relazione l'assorbimento degli integratori alimentari non solo con il tessuto muscolare ma anche con quello nervoso. In particolare l'assunzione di amminoacidi a catena ramificata (ACR) leucina, isoleucina e valina e/o di creatina potrebbe in qualche modo favorire la manifestazione clinica della SLA. Oltre alle osservazioni di tipo epidemiologico, tale ipotesi è sostenuta anche da una convincente base biologica, in quanto gli ACR sono importanti per la sintesi *de novo* del glutammato, e è noto come un aumento dei livelli di tale neurotrasmettitore possa determinare danno neuronale.

Questo progetto si propone di verificare l'ipotesi che l'assunzione di una dieta ricca in amminoacidi a catena ramificata (ACR) possa accelerare e/o aggravare l'espressione del fenotipo in topi SOD1 (modello genetico di SLA).

Risultati attesi nel triennio

I risultati di questo studio potrebbero avvalorare l'ipotesi che gli amminoacidi ramificati, abitualmente assunti in dosi massicce dai calciatori e da numerose altre categorie di sportivi come integratori alimentari, possano contribuire ad aumentare il rischio di SLA in questi soggetti.

Il progetto dovrebbe consentire il raggiungimento dei seguenti risultati specifici: i) valutazione (tramite studi comportamentali, elettrofisiologici e neurochimici) del ruolo della esposizione ad ACR sull'insorgenza di sintomi neurologici in un modello murino di SLA (topi transgenici per SOD1); ii) valutazione dell'influenza della dieta arricchita con ACR sulla funzionalità dei sistemi di trasporto del glutammato e sui livelli extracellulari del trasmettitore a

livello corticale e spinale in topi transgenici per SLA; iii) studio delle eventuali modifiche della trasmissione/plasticità sinaptica in fettine corticali prelevate da animali a diverse fasi della malattia; iv) monitoraggio mediante MRS delle variazioni dei livelli di differenti metaboliti a livello corticale durante l'evoluzione della patologia nel modello murino (fasi individuate con approcci diversi).

Trasferibilità dei risultati

Trattandosi di un progetto di ricerca di base, le sue ricadute saranno di tipo prevalentemente conoscitivo. In particolare, il progetto consentirà di approfondire la conoscenza degli effetti fisiologici e tossici dell'uso di sostanze che, anche se non espressamente vietate, sembrano essere assunte a dosi molto superiori a quelle raccomandate. Qualora i risultati dello studio dovessero confermare l'ipotesi di un ruolo favorente dell'assunzione di tali sostanze nella SLA, il progetto potrebbe avere anche ricadute importanti in termini di sanità pubblica e di controllo del doping.

Studio dei correlati elettrofisiologici e neurochimici del deficit cognitivo da deafferentazione colinergica e da deprivazione trofica

Questa ricerca si propone il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- analizzare “longitudinalmente” i tracciati EEG di animali sottoposti a lesione immunotossica delle vie colinergiche o geneticamente deprivati di fattori trofici al fine di identificare eventuali alterazioni precoci dell'attività elettrica corticale e di studiare la possibile correlazione tra alterazioni EEG e compromissione cognitiva;
- studiare la trasmissione e la plasticità sinaptica in fettine di ippocampo provenienti dagli animali sottoposti a lesione immunotossica, al fine di chiarire il ruolo patogenetica della deafferentazione colinergica nell'insorgenza della disfunzione ippocampale;
- studiare la neurotrasmissione glutammatergica ippocampale e corticale nei modelli suddetti.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione dei correlati elettrofisiologici e neurochimici della lesione immunotossica in rapporto allo sviluppo del deficit cognitivo. Studi di microdialisi in topi sottoposti a deprivazione genetica di fattori trofici (modello transgenico di Alzheimer). Identificazione di parametri misurabili e riproducibili sui quali verificare l'efficacia di interventi terapeutici e eventuali finestre temporali per l'intervento.

Studio dei marker subcellulari di longevità e degenerazione cellulare

È noto che 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 isotipo 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.

Risultati attesi nel triennio

Principali finalità del progetto sono: i) la valutazione in diversi sistemi cellulari di senescenza *in vitro* (cellule di diverso isotipo 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.

Studio del sistema ADEPT (*antibody-directe enzyme prodrug therapy*) mediante un approccio basato sul modello cellulare MDR e frammenti anticorpali ricombinanti scFv

La particolarità genetico-molecolare degli scFv permette, attraverso semplici manipolazioni, di costruire proteine di fusione che combinano insieme la specificità delle immunoglobuline con i principi terapeutici che si intendono veicolare in una predefinita localizzazione tissutale. Rimane tuttavia da stabilire se questi frammenti anticorpali posseggano caratteristiche immunochimiche tali da renderli utilizzabili in un sistema ADEPT o più in generale se risultino adeguati come vettori di principi curativi. Ed è proprio in questo contesto che si collocano gli obiettivi del progetto che intende verificare attraverso un ben definito modello di cellulare se: a) le proteine di fusione composte da scFv e enzimi specifici risultino efficienti quanto gli anticorpi monoclonali di origine ibridomatosi modificati chimicamente nel convertire in sede peritumorale profarmaci inerti in composti citotossici. b) le caratteristiche funzionali degli anticorpi risultino alterate e a che livello in seguito a conversione geneticamente ricombinata in frammenti scFv. In particolare verrà valutato se la forma scFv dell'anticorpo UIC2 libera o legata a un enzima mantiene la capacità di rendere di nuovo suscettibili cellule MDR al trattamento farmacologico con una efficienza paragonabile alla sua controparte di origine ibridomatosi. I risultati di questi studi possono fornire utili indicazioni non solo sulla efficacia di ADEPT ma più in generale sulla fattibilità di immunoterapie mediate da anticorpi. Infatti, una serie di immunoglobuline monoclonali che sembravano di estremo interesse non sono state ulteriormente sviluppate a causa della presenza di severe controindicazioni che emergevano in seguito alla loro somministrazione. La conversione in forma scFv di questi anticorpi riducendo costi e fenomeni avversi (HAMA, tossicità ecc.) darebbe nuovo impulso al loro sviluppo.

Risultati attesi nel triennio

Complessi formati da scFv diretti verso la P-glicoproteina (o antigeni tumore-associato, i.e., CEA) con enzimi quali la penicillin V amidasi (PVA) e la carboxipeptidasi G2 (CP-G2). La PVA servirà al complesso veicolato in zona peritumorale per attivare derivati fenoxiacetamidici della doxorubicina (inerti) nel noto e largamente sperimentato farmaco antitumorale. CP-G2 verrà utilizzato per la conversione di CMDA 4 (2-chloroethyl. 2-mesyloxyethyl.amino -benzoyl-L-glutamic acid) in DMXAA (5,6, dimethyl-xantenone-4-acetic acid) che inibisce in modo selettivo il flusso sanguigno dei vasi neo-formati dei tumori causando estese necrosi emorragiche. L'efficacia del sistema ADEPT ricombinante verrà valutata per la sua capacità a) di distruggere selettivamente cellule tumorali in modelli animali utilizzando la P-glicoproteina come antigene bersaglio; b) di mantenere le capacità revertanti del

fenotipo MDR da parte degli anticorpi ricombinanti; c) di esercitare la sua azione in rapporto ai livelli di espressione, numero e distribuzione di molecole della P-glicoproteina. Comunque il sistema potrà essere esteso ad altri antigeni tumore associato (i.e., CEA).

Trasferibilità dei risultati

Trattamento dei tumori refrattari al trattamento farmacologico mediante immunochemioterapia mirata che utilizza anticorpi monoclonali anti-P-glicoproteina per attivare composti inerti in potenti citotossici. Il progetto prevee di ampliare lo spettro degli antigeni bersaglio tumore-associato sviluppando scFv diretti verso il CEA.

Studio delle basi perinatali di patologie croniche dell'adulto

Le ricerche saranno effettuate in genere con modelli preclinici e clinici in parallelo, e comprenderanno ricerche sui meccanismi che determinano alterazioni della normale organogenesi nei periodi critici dello sviluppo e sul *fetal and neonatal programming*, vale a dire sulle basi biologiche perinatali di alcune patologie, o fattori di rischio di patologie, croniche dell'adulto (sindrome metabolica, dislipidemie, diabete di tipo 2, ipertensione arteriosa, patologie autoimmuni) (v. *Pediatric Res*, 2006, 59:1-6). Queste ricerche, i cui risultati ottenuti su animali maschi sono già in parte pubblicate, verranno estese anche a gruppi di genere femminile. Da un punto di vista clinico sarà completata una ricerca sui periodi critici dello sviluppo nei riguardi del peso corporeo e del rischio di ipertensione arteriosa nelle adolescenti anche in relazione alla comparsa del menarca. Una delle linee sarà dedicata allo studio delle basi biologiche (studio di steroidi e neurosteroidi cerebrali) della epilessia catameniale, sia in un modello di epilessia congenita del topo DBA/2, sia in un campione di pazienti attraverso uno studio collaborativo. Sarà aperta una nuova linea di ricerca su patologie rare e farmaci orfani, sia in modelli animali e cellulari che nell'ambito di ricerche cliniche, con studi collaborativi.

Risultati attesi nel triennio

Si prevedono almeno due livelli: il primo è di tipo conoscitivo. Negli ultimi anni la letteratura scientifica si è molto impegnata sui temi definiti come *programming* e sulle conseguenze indotte da uno sviluppo alterato di organo e organuli cellulari sulla funzionalità di sistemi nell'adulto, e quindi su grandi problemi di salute e benessere. Le prime fasi dei nostri studi saranno quindi dedicate all'approfondimento dei rapporti tra *stress* ripetuto perinatale e tipologie, e severità, delle alterazioni funzionali e morfologiche indotte dallo *stress* perinatale sulla costellazione di ormoni, sui parametri neurofisiologici, cardiovascolari, del metabolismo glucidico e lipidico, sulla respirazione cellulare, sui meccanismi di nocicezione, sui meccanismi di regolazione neuroumorale tra i sistemi immunitari di tipo pro-infiammatorio e anti-infiammatorio, e così via. È stato già dimostrato nei nostri dati (non pubblicati) una diversa reattività del genere maschile verso il genere femminile in molti di questi parametri. Il secondo, di tipo terapeutico, varrà a studiare similitudini e differenze tra i due generi nelle espressioni fenotipiche e fisiopatologiche conseguenti a stress ripetuti perinatali, e il passo successivo sarà di validare gli effetti protettivi di alcuni farmaci sulle alterazioni morfo-funzionali di lunga durata prodotte dallo *stress*, (v: *Brain Res Bull*, 2004,63:491-7) e di studiare altre possibilità di prevenzione farmacologica, anche genere-mirata.

Trasferibilità dei risultati

Le ricerche di base studiano i rapporti tra *stress* perinatale e rischio di patologie cardiovascolari, comportamentali e dismetaboliche nei roditori adulti. Per un possibile trasferimento all'uomo, i nostri dati suggeriscono di evitare le occasioni di *stress* che spesso colpiscono i bambini senza che lo stress venga percepito come tale dai sanitari o dai parenti. Ad esempio, è diffuso l'assunto che i bambini "sentono poco il dolore e non lo ricordano". Ciò è falso. Sarà nostra cura dare diffusione dei risultati nostri e della letteratura, allo scopo di

coinvolgere la classe sanitaria ad una prevenzione migliore dello *stress* e del dolore in pediatria, nella vita quotidiana e nelle manovre mediche.

Per il programma di lavoro nell'uomo, riteniamo che un controllo accurato del peso corporeo e della pressione arteriosa negli adolescenti possa essere importante per mettere in atto le misure atte a prevenire fattori di rischio per la salute (obesità, ipertensione) nell'età adulta.

Studio dell'effetto immunomodulante di proteine virali e farmaci antiretrovirali

La proteina regolatoria Nef di HIV-1 è un determinante critico nella patogenesi dell'AIDS. Poiché a tutt'oggi, non sono stati del tutto chiariti i meccanismi utilizzati dal virus per evadere la risposta immune dell'ospite, il presente progetto si propone di studiare le interazioni di Nef con gli effettori dell'immunità innata e acquisita. In questo contesto, abbiamo recentemente dimostrato che Nef inibisce l'attività funzionale dei linfociti B e dei linfociti T CD8+, contribuendo probabilmente alla disfunzione della risposta umorale e cellulo-mediata. Quindi, al fine di chiarire il ruolo di Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS, verrà completato lo studio dei meccanismi di inibizione esercitati da Nef sui linfociti B e valutato l'effetto di Nef sulle cellule *natural killer* (NK) la cui attività funzionale è disregolata durante l'infezione da HIV ed è verosimile che vengano a contatto con la proteina Nef rilasciata dalla lisi della cellula ospite. Inoltre, poiché le cellule dendritiche (DC) contribuiscono alle risposte innate contro i patogeni e regolano l'attivazione delle risposte immuni adattative, verrà valutata l'interferenza di Nef nel *cross-talk* DC/NK. I farmaci antivirali, determinano effetti tossici e possono inoltre alterare le funzioni immunitarie. Risulta quindi chiaro che, studiare l'immunomodulazione farmaco-dipendente è di interesse anche su PBMC normali, considerando che questi farmaci vengono somministrati a pazienti già immunocompromessi.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio è finalizzato a definire il ruolo di Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS valutando le interazioni di Nef con gli effettori dell'immunità innata e acquisita.

Questo potrebbe essere utile per identificare strategie terapeutiche che favoriscono l'attivazione dell'immunità anti-virale piuttosto che favorire la disseminazione del virus. Nef anche se altamente variabile, è un ottimo candidato per un vaccino combinato in quanto viene precocemente espressa durante l'infezione, ha un ruolo chiave nella patogenesi dell'AIDS, ed è in grado di stimolare una efficiente risposta cellulare. Quindi, i risultati ottenuti nei nostri studi in vitro, possono contribuire a capire le funzioni, il meccanismo di azione e i *partner* cellulari e molecolari di Nef, al fine di sviluppare strategie terapeutiche volte sia ad esporre gli epitopi immunodominanti e a mascherare le sequenze responsabili degli effetti immunopatogenici di Nef, sia a supportare la messa a punto di farmaci anti-Nef. Il chiarimento dei meccanismi coinvolti nell'immunomodulazione farmaco-dipendente può orientare lo sviluppo di nuovi farmaci che, pur mantenendo un'efficace attività antivirale, risultino meno tossici e può suggerire l'uso di nuove combinazioni.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio proposto, potranno contribuire a capire le funzioni, il meccanismo di azione e i *partner* cellulari e molecolari della proteina Nef nella interazione con la DC. Questo, al fine di definire il ruolo della proteina Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS e di supportare la messa a punto di costrutti codificanti versioni mutate di Nef che mantengono gli epitopi immunodominanti in grado di attivare le DC e i linfociti T citotossici, ma privi delle porzioni responsabili degli effetti immunopatogenici, ottenendo così la stimolazione di cloni T Nef-specifici. Quindi, gli studi proposti potrebbero essere utili per lo sviluppo di strategie terapeutiche, che favoriscano l'attivazione dell'immunità anti-virale e di farmaci anti-Nef.

Inoltre, l'impiego di opportuni modelli *in vitro* potrebbe consentire di saggiare l'efficacia e l'immunotossicità di farmaci di nuova generazione.

Studio di metodiche analitiche per la determinazione nei fluidi biologici di remifentanil e ketamina utilizzati per l'analgia endovenosa nel travaglio da parto

Una valida alternativa all'utilizzo dell'anestesia epidurale per controllare il dolore da parto, nei casi in cui sia rifiutata dalla paziente o presenti delle controindicazioni, è l'utilizzo di oppioidi per via endovenosa.

Il Remifentanil è un oppioide di sintesi che presenta scarsi effetti collaterali materno-fetali in quanto è caratterizzato da un rapido *on-set*, breve cinetica di eliminazione ed emivita; grazie al rapido metabolismo ad opera di esterasi plasmatiche e tissutali. Tuttavia recenti studi hanno evidenziato che l'efficacia analgesica del farmaco non è ottimale. Per superare questo problema è possibile utilizzare ketamina, un farmaco che potenzia l'analgia con oppiacei, agendo sui recettori NMDA. È pertanto importante verificare gli effetti materno-fetali dell'associazione Remifentanil-Ketamina nel travaglio da parto e a questo scopo è necessario mettere a punto metodiche analitiche per la determinazione dei farmaci in fluidi biologici, prelevati dalla madre e dal bambino.

Risultati attesi nel triennio

Nostro scopo è la messa a punto di metodi per la determinazione quantitativa di Remifentanil e Ketamina e eventuali metaboliti in fluidi biologici al fine di determinare la relativa farmacocinetica e farmacodinamica. Le maggiori difficoltà sono rappresentate dall'eliminazione di interferenze dovute ai fluidi biologici da esaminare (sangue e/o plasma) e la bassa concentrazione del farmaco e dei suoi metaboliti.

I risultati dello studio attesi saranno quindi:

metodiche estrattive convalidate rapide ed efficaci messe a punto in maniera da ottenere un campione arricchito del farmaco e dei suoi metaboliti

metodiche analitiche convalidate messe a punto per la analisi dei campioni estratti. Si utilizzeranno tecniche cromatografiche accoppiate alla rivelazione tramite spettrometria di massa data la peculiare elevata selettività e sensibilità di queste metodiche

dati dello *screening* di campioni prelevati da diverse coppie madre-bambino.

Trasferibilità dei risultati

La migliore conoscenza della farmacocinetica e farmacodinamica dell'associazione Remifentanil-Ketamina, in connessione con il rilevamento degli effetti collaterali, permetterà di avere una valida, efficace e sicura alternativa alla tecnica epidurale nelle pazienti nelle quali non è possibile utilizzare questa terapia migliorando e aumentando così l'offerta di analgesia alle partorienti.

Studio di nuovi principi attivi naturali estratti da "Heliconia psittacorum" e loro azione antivirale

Attraverso i centri di salute e ospedali missionari in Africa, abbiamo potuto raccogliere diverse informazioni sull'efficacia clinica di alcune specie di piante medicinali africane, che rappresentano spesso la terapia di elezione per pazienti affetti da varie malattie e in particolare dall'AIDS. Di tali informazioni esistono relazioni, redatte dal personale medico universitario di vari Istituti, che confermano l'attività *in vitro* di un estratto, da noi formulato, di una pianta proveniente da questi Paesi. Tale pianta l'"*Heliconia psittacorum*" della famiglia delle *Musaceae*, cresce spontanea in tutte le zone tropicali e subtropicali e viene utilizzata per curare

in particolare i malati di AIDS. Il programma di ricerca in esame prevee lo sviluppo di una fase chimico-estrattiva, per l'isolamento e l'identificazione dei principi contenuti in tale pianta e una conseguente fase biologica per la determinazione della loro attività HIV-inibitrice.

In particolare saranno effettuati tests di efficacia antivirale contro HIV dell'estratto grezzo su diversi tipi cellulari umani e sarà studiata la tossicità nei confronti del metabolismo cellulare.

Contestualmente sarà effettuato uno studio finalizzato a valutare se la tossicità dell'estratto totale è dovuta allo stesso oppure ad altri principi attivi rispetto a quelli dotati di effetto anti-HIV. Oltre a questi *test* saranno effettuate valutazioni di efficacia antivirale su altri virus al fine di caratterizzare l'effetto anti-HIV come specifico, oppure ad ampio spettro.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo primario della presente ricerca è quello di isolare nuovi metaboliti da questa pianta e sue parti usate come antivirali, tra cui quello dell'HIV nella Medicina Tradizionale africana.

Gli estratti della pianta e sue parti saranno progressivamente frazionati fino all'isolamento dei componenti attivi, che verranno caratterizzati dal punto di vista chimico. L'indagine strutturale delle sostanze ottenute si avvarrà di metodi chimici e spettroscopici, in particolare di UV, IR, 1H e 13C NMR mono o bidimensionali, spettrometria di massa.

Le sostanze isolate e caratterizzate chimicamente possono rappresentare validi modelli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci e/o punto di partenza per nuove soluzioni terapeutiche.

Tutte le sostanze identificate negli estratti di tale pianta saranno sottoposti ai saggi dell'attività biologica. L'attività *in vitro* dell'estratto grezzo della pianta verrà valutata per dimostrarne l'efficacia antivirale contro l'HIV su diversi tipi cellulari umani e sarà studiata la tossicità nei confronti del metabolismo cellulare.

Trasferibilità dei risultati

Le osservazioni cliniche fanno supporre che oltre a un effetto antivirale diretto, si possa ipotizzare un effetto indiretto degli estratti, mediato dall'azione dei principi attivi sui sistemi di difesa dell'ospite. Questo progetto ha lo scopo di verificare la potenziale efficacia dei principi attivi isolati sulla modulazione di alcune risposte immunitarie che giocano un ruolo importante nel controllo delle infezioni.

Saranno testati i prodotti singolarmente e in associazione tra loro, al fine di evidenziare se l'efficacia antivirale è legata ad una singola frazione, oppure all'effetto sinergico di due o più frazioni.

Il materiale grezzo e le varie sostanze isolate, saranno oggetto di studio da parte di laboratori competenti nel campo dell'HIV che svolgeranno le specifiche ricerche atte a dimostrare quell'attività antivirale che la Medicina Tradizionale attribuisce a tale pianta.

Studio strategico randomizzato di interruzione terapeutica in pazienti HIV-positivi che iniziano la terapia antiretrovirale

I regimi HAART (terapie antiretrovirali altamente attive), pur avendo cambiato radicalmente la storia naturale dell'infezione da HIV, sono costosi, a volte complessi da seguire e spesso responsabili di effetti tossici anche gravi. Per questi motivi da alcuni anni sono stati sperimentati approcci che, con modalità diverse, hanno valutato la possibilità di sospendere per periodi variabili la somministrazione dei farmaci. L'ISS ha dato un contributo importante in questo campo con lo studio multicentrico ISS PART, uno dei pochi trial randomizzati sulle interruzioni terapeutiche condotti in tutto il mondo.

Dai risultati delle varie ricerche è oggi possibile concludere che in pazienti selezionati le interruzioni "CD4 guidate", nelle quali si utilizza il numero dei linfociti CD4+ come guida per il monitoraggio del paziente e la ripresa del trattamento, sono fattibili e esenti da effetti collaterali,

almeno nel breve-medio termine. Tutti i risultati, tuttavia, sono stati ottenuti in pazienti trattati da anni e che avevano iniziato la terapia sulla base di linee guida diverse dalle attuali, e non è noto in quanti e quali pazienti che iniziano la HAART secondo le linee guida correnti tale strategia sia applicabile.

Per rispondere a questo quesito di grande rilevanza clinica è nostra intenzione condurre uno studio strategico, multicentrico, in soggetti che sulla base delle linee guida attuali sono candidati a iniziare la HAART, e che verranno randomizzati a una terapia continua (*standard of care*) o a una basata su interruzioni CD4 guidate. Lo studio includerà circa 400 pazienti e durerà 5 anni.

Risultati attesi nel triennio

valutare in quali e quanti pazienti che inizino la HAART in presenza di un numero di linfociti CD4+ > 200 cellule/uL, in accordo alle attuali linee guida di terapia antiretrovirale, sia possibile applicare la strategia di interruzione terapeutica CD4-guidata;

valutare l'outcome clinico e viro-immunologico a lungo termine (5 anni) di questa strategia in confronto ad una terapia convenzionale, continua.

valutare lo sviluppo di effetti collaterali legati alla assunzione di farmaci (ad es. lipodistrofia, dismetabolismi).

valutare l'influenza di tale strategia sull'aderenza e sulla qualità della vita dei pazienti.

valutare le implicazioni economiche di una strategia basata sulle interruzioni terapeutiche.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio risponderà a una quesito clinico tuttora insoluto e potrà avere importanti ricadute sia per quanto riguarda lo sviluppo di effetti collaterali legati alla HAART che l'aderenza alla terapia e la qualità di vita dei pazienti. Le interruzioni terapeutiche comporteranno inoltre un risparmio economico che, in assenza di effetti collaterali, potrà tradursi in un notevole vantaggio per il Servizio Sanitario.

Sviluppo di formulazione pediatriche ed elaborazione delle relative monografie di Farmacoepa

La qualità è il requisito che consente di garantire l'efficacia e la sicurezza. Questo aspetto è particolarmente rilevante, cruciale e da evidenziare e ribadire in ambito neonatologico e pediatrico dove nella maggior parte delle patologie sono utilizzati principi attivi che per dosaggio e/o forma farmaceutica non hanno medicinali con autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) oppure l'uso non è indicato ma la letteratura accreditata ne avvalorava l'impiego. Ci si propone di: a) studiare e individuare le preparazioni farmaceutiche per uso neonatologico e pediatrico; b) definire i requisiti di qualità delle materie prime utilizzate con particolare attenzione alla problematica dei contaminanti quali i metalli pesanti (es. Al), la qualità e l'appropriatezza della forma farmaceutica prescelta (es. sciroppo, preparazione iniettabile, soluzione perfusione) e dei contenitori; c) elaborare le relative monografie di farmacoepa anche armonizzate con eventuali monografie presenti nelle Farmacoepa di altri paesi dell'Unione Europea o testi rilevanti specifici accreditati/riconosciuti e nell'ambito di applicazione delle Norme di Buona Preparazione dei Medicinali in Farmacia; d) coinvolgere e collaborare con le Parti interessate: clinici che operano in neonatologia e pediatria, pediatri, farmacisti ospedalieri (es. SIFO), farmacisti preparatori territoriali (es. SIFAP), Autorità regolatorie (AIFA, Min. Salute), esperti in materia

Risultati attesi nel triennio

a) Avviare un programma di collaborazione tra le Parti coinvolte; b) Definire i requisiti di qualità delle preparazioni farmaceutiche per uso neonatologico e pediatrico; c) elaborare le relative monografie di Farmacoepa

Trasferibilità dei risultati

Le monografie di preparazioni farmaceutiche per uso neonatologico e pediatrico rappresenterebbero il supporto tecnico-scientifico e normativo per assicurare la qualità della terapia in ambito ospedaliero e la sua eventuale continuazione sul territorio

Sviluppo di metodologie chimiche e farmacologiche per la valutazione di qualità e sicurezza dei preparati erboristici

L'apertura delle frontiere a un mercato oramai mondiale, rende necessario un maggiore controllo della qualità e della sicurezza dei preparati erboristici, la cui tossicità potenziale nell'uomo e nell'animale potrebbe essere influenzata non solo dalla qualità del prodotto stesso, ma anche dal tipo di droghe vegetali in esso contenute e dalle eventuali sofisticazioni. Queste formulazioni sono disponibili sul mercato come prodotti di libera vendita, vengono presentati in modo tale da non poter vantare attività terapeutica al di fuori di quella salutistica, non sono soggetti a tutti gli obblighi, limitazioni e vincoli dei prodotti farmaceutici e per tale motivo possono essere anche venduti in esercizi diversi dalla farmacia. La stima WHO indica che da 35 a 75000 specie di piante vengono utilizzate per scopi medicinali e per solo 5000 di queste è stata valutata e comprovata l'efficacia scientifica. Lo studio di questi preparati è reso particolarmente articolato in quanto le droghe vegetali in essi presenti sono in associazione tra di loro e molto spesso lo sono anche con sostanze animali, minerali e metalli pesanti. L'obiettivo della ricerca è quello di studiare:

- lo sviluppo di metodologie chimiche e farmacologiche atte a verificare:
- la biodisponibilità (Cmax, Tmax e AUC) delle molecole presenti nei prodotti;
- l'eventuale specifica attività;
- la reale tossicità di queste sostanze nell'uomo e nell'animale.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo del progetto è determinare un metodo capace di affrontare gli aspetti relativi alla tossicità dei preparati erboristici. È necessario che gli aspetti connessi con la valutazione potenziale di effetti tossici, derivanti dall'uso incontrollato di questi prodotti, sia analizzato in modo scientificamente corretto soprattutto relativamente alla tossicità *in vivo* di alcuni preparati erboristici.

Alcune delle droghe che si prenderanno in considerazione sono quelle che in altri Paesi europei hanno provocato gravi effetti collaterali quali per esempio il bulbo di *Fritillaria ussuriensis*, il seme del *Prunus armeniaca* e il rizoma del *Piper metisticum*; altre saranno droghe che sono attualmente in commercio e che, se assunte in grande quantità, potrebbero causare altrettanti effetti collaterali come per esempio il rizoma della *Cimicifuga racemosa* (L.) Nuttall, la foglia dell'*Arctostaphylos uva ursi* (L.) Sprengel, l'erba dell'*Echinacea purpurea* Moench e la corteccia di *Uncaria tormentosa* (DC).

Altre piante da esaminare saranno quelle ampiamente utilizzate nella medicina Ayurvedica, assai meno note, di provenienza orientale, per le quali ancora poco si è studiato sul loro metabolismo proprio grazie alla scarsità di documentazione e dati scientifici reperibili.

Trasferibilità dei risultati

Salvaguardare la salute pubblica attraverso l'individuazione di metodi effettuati sia *in vivo* che *in vitro* atti a verificare la non tossicità del preparato erboristico. Si elaboreranno criteri e metodi per la valutazione della qualità e sicurezza dei prodotti oggi disponibili sul mercato, in quanto da questa dipende la tutela della salute del cittadino. La valutazione degli effetti tossici potenziali derivati dall'uso incontrollato di questi prodotti, potrebbe fornire un idoneo modello sperimentale, riproducibile, che consenta di valutare su grande scala tali prodotti, stabilendone la classificazione come farmaco o prodotto salutistico. Nella fase attuale, l'ipotesi di lavoro

degli autori, è di valutare la possibilità di standardizzare un modello animale per studiare alcuni preparati erboristici e i loro componenti, associati o singolarmente, al fine di valutarne, con metodiche analitiche in grado di identificare il principio attivo e i suoi metaboliti, la biodisponibilità e la eventuale tossicità.

Sviluppo di metodologie chimiche e microbiologiche per la verifica della qualità e sicurezza dei prodotti cosmetici

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;
- 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.

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 76/768/CEE e il relativo recepimento nazionale, Legge 713/86) implementata mediante l'approvazione della XXXIII modifica della Commissione CE e della VII modifica della Direttiva 76/768/CEE, prevede per l'Istituto Superiore di Sanità, 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 1000 voci che possono espandere ad oltre 2500 se si considerano le sostanze apparentate e i derivati previsti in alcuni casi) 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 modifiche XXXI-XXXV della Direttiva 76/768/CEE, 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 per lo *screening* e la valutazione pre-clinica degli Inibitori dell'Integrasi dell'HIV-1

Le principali cause di riduzione dell'efficacia della terapia anti HIV sono la tossicità dei farmaci, la complessità dei regimi terapeutici e soprattutto l'insorgenza di mutazioni nel genoma virale in grado di conferire resistenza nei confronti del trattamento farmacologico somministrato; quanto descritto costituisce il razionale per la ricerca di nuovi farmaci anti HIV e soprattutto nuove classi di farmaci. A tutto oggi lo *screening high-throughput* di nuove sostanze attive nei confronti di un enzima virale, sia che avvenga in un sistema cellulare semplificato quale i lieviti, che in assenza di cellule, come nei saggi biochimici, avviene valutando il singolo e ben definito aspetto della replicazione virale in cui l'enzima è coinvolto. Il saggio ideale di *screening in vitro* di nuove sostanze dovrebbe essere caratterizzato dalla possibilità di valutare un gran numero di sostanze in breve tempo, dalla semplicità di esecuzione, dall'uso di agenti biologici e chimici dotati di basso rischio per l'operatore, da costi contenuti ma soprattutto dalla capacità di simulare le condizioni più simili a quelle in cui il farmaco si troverebbe ad agire clinicamente. L'entrata degli inibitori della integrasi dell'HIV nella prime fasi della sperimentazione clinica rende anche necessaria l'individuazione di un saggio capace di valutare l'impatto della inevitabile insorgenza di mutazioni sull'efficacia terapeutica.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto ha come obiettivo lo sviluppo di un saggio di *screening high-throughput* per sostanze con attività anti integrasi dell'HIV e di un saggio per la valutazione delle resistenze fenotipiche.

Abbiamo valutato l'attività di inibitori dell'integrasi nei confronti della replicazione di un isolato virale di HIV-1 in colture di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori sani. Malgrado i risultati ottenuti siano congrui con quanto descritto in letteratura molti aspetti limitano l'impiego di questo saggio come *screening high-throughput*.

Per tentare di superare questi limiti, abbiamo messo a punto e stiamo sperimentando un saggio di *screening* basato sulla valutazione della capacità degli inibitori di interferire con la espressione di luciferasi da parte di vettori lentivirali a singolo ciclo replicativo in linee cellulari aderenti coltivate in micropiastre. La capacità della sostanza nell'impedire in modo specifico l'integrazione sarà valutata utilizzando vettori lentivirali integrasi difettivi come controllo.

Lo stesso saggio sarà utilizzato per saggiare le resistenze fenotipiche di virus con mutazioni nel gene della integrasi dopo il suo clonaggio molecolare e inserimento nei vettori lentivirali.

Trasferibilità dei risultati

Il saggio che stiamo sperimentando fornirà uno strumento per la valutazione di sostanze con attività anti integrasi di HIV-1. Questo saggio rappresenta un modello fedele della replicazione dell'HIV-1, è dotato di controlli per la specificità del farmaco analizzato, è di rapida esecuzione, ha rischi biologici ridotti e è eseguito interamente in micropiastre dalla coltura alla rivelazione della proteina *reporter*.

Questo metodo di *screening high-throughput* degli inibitori dell'integrasi basato su un modello cellulare consentirà di accelerare lo sviluppo di questa classe di farmaci fornendo dati di efficacia antivirale più vicini a quelli *in vivo* rispetto ai classici saggi enzimatici attualmente utilizzati.

L'applicazione di questo saggio alla valutazione fenotipica delle mutazioni indotte dai nuovi inibitori della integrasi può costituire un facile strumento per la comprensione dell'impatto delle mutazioni della sequenza genomica dell'integrasi sulla capacità replicativa del virus HIV.

Sviluppo e caratterizzazione di anticorpi monoclonali somatici e ricombinanti per lo studio strutturale e funzionale della P-glicoproteina e per la risensibilizzazione di cellule tumorali MDR al trattamento chemioterapico

La resistenza multipla ai farmaci (MDR) è uno dei più rilevanti ostacoli per una efficace chemioterapia in molti pazienti affetti da tumore inoperabile. Sebbene di origine multifattoriale la MDR risulta spesso associata con aumentati livelli di espressione della P-glicoproteina che agendo come meccanismo di efflusso riduce la concentrazione intracellulare di una vasta gamma di chemioterapici. L' inibizione della P-glicoproteina da parte di anticorpi monoclonali specifici può rappresentare un valido metodo per la risensibilizzazione dei tumori non più responsivi al trattamento farmacologico.

Il progetto si pone come obiettivo di sviluppare e produrre modulatori della P-glicoproteina di origine biotecnologica che agendo in modo selettivo e specifico non interferiscano con gli enzimi deputati al metabolismo dei farmaci (enzimi del citocromo P450). Gli anticorpi monoclonali alcuni dei quali già isolati e caratterizzati per specificità di riconoscimento verranno esaminati singolarmente o combinati fra loro in miscele calibrate per verificare le loro capacità inibenti sul meccanismo di azione della P-glicoproteina in presenza dei diversi farmaci correntemente utilizzati nella chemioterapia dei tumori. Inoltre, verranno condotti studi per verificare eventuali sinergie fra anticorpi e i più recenti modulatori di origine chimica (Tariquidar XR9576; Zosuquidar LY335979, Laniquidar R101933) caratterizzati da alta efficienza di reversione della MDR e da una ridotta interazione con gli enzimi del citocromo P450. In considerazione delle potenzialità applicative di queste ricerche, gli anticorpi (e/o le loro combinazioni predefinite) che mostrino capacità di modulare le funzioni della P-glicoproteina verranno convertiti mediante procedure di ingegneria genetica in forma scFv (di derivazione murina e/o umana) ed espressi congiuntamente ad isotipi umani per la produzione di immunoglobuline chimeriche e/o umane. Inoltre verranno condotti studi per isolare nuovi anticorpi monoclonali sia di origine somatica che ricombinante (mediante selezione di librerie fagiche anticorpali sintetiche su cellule umane MDR e/o su peptidomimetici della P-glicoproteina) con l'obiettivo di i) aumentare il corredo di reagenti di origine biologica capaci di modulare le funzioni della P-glicoproteina, ii) isolare anticorpi scFv di origine umana da utilizzare per scopi applicativi.

Risultati attesi nel triennio

Effetti e sinergie sul blocco del meccanismo di trasporto della P-glicoproteina esercitati da anticorpi monoclonali specifici. Gli studi verranno effettuati con anticorpi monoclonali somatici di origine ibridomatosi (bs MM4.17, MM12.10, MM8.15, MC57, MM13.4 e UIC2 (purificati al 95-99%) e si articoleranno attraverso lo sviluppo delle seguenti fasi sperimentali; a) analisi degli effetti sinergici sulla modulazione della P-glicoproteina da parte dei singoli anticorpi e delle loro combinazioni (PoliMAbs) in presenza di concentrazioni di Vinblastina, Vincristina e Doxorubicina uguali e/o inferiori a quelle osservate nel plasma di pazienti affetti da tumore e trattati con questi farmaci. Sinergie sul blocco della P-glicoproteina esercitate da anticorpi e modulatori chimici della MDR in fase di sperimentazione clinica, b) studio degli effetti sinergici sulla modulazione della P-glicoproteina esercitati da MAbs e PoliMAbs in combinazione con il Valspodar (PSC8333) e inibitori della 3a generazione (Tariquidar XR9576; Zosuquidar LY335979, Laniquidar R101933) caratterizzati da una elevata efficienza e ridotta interferenza con le funzioni del citocromo P450 3A4, c) Isolamento di frammenti immunoglobulinici in formato scFv da librerie anticorpali fagiche sintetiche mediante *biopanning* su cellule umane MDR e/o su peptidi che mimano la conformazione di epitopi della P-glicoproteina, d) riformulazione genica dei MAbs anti P-glicoproteina. Le ricerche consisteranno nella verifica delle capacità inibitorie degli scFv isolati da librerie fagiche anticorpali e/o ottenuti mediante espressione dei geni VH e VL di specifici ibridomi (lo studio include la mutagenizzazione sito-

mirata dei geni codificanti per le CDRs degli scFv per aumentare il livello di affinità di legame dei frammenti immunoglobulinici specifici.

Trasferibilità dei risultati

1. Caratterizzazione dei livelli di resistenza nei tumori mediante anticorpi monoclonali diretti verso la P-glicoproteina. 2. Ripristino della suscettibilità dei tumori MDR al trattamento chemioterapico mediante inibizione della P-glicoproteina con anticorpi monoclonali somatici chimerici e/o ricombinanti umani in forma di scFv.

Sviluppo, validazione e applicazione di metodiche analitiche per la valutazione della qualità di farmaci antimalarici, antitubercolari e antiretrovirali del mercato informale nei Paesi in via di sviluppo

La vendita al mercato informale di farmaci nei Paesi in via di sviluppo (PVS) accentua il fenomeno della contraffazione farmaceutica, inoltre, le scarse disponibilità economiche delle popolazioni e la difficoltà di accesso ai farmaci essenziali in questi Paesi favorisce il commercio di farmaci generici sub-standard in qualità. Dati dell'OMS indicano intorno al 19% la quantità di farmaci contraffatti venduti nei Paesi Africani, con punte fino al 50% e oltre per i Paesi più poveri e dove sono minori i controlli. I farmaci maggiormente contraffatti sono gli antimalarici, gli antitubercolari, gli antiretrovirali (ARV) e gli antibiotici. Inoltre, per la maggior parte degli ARV non esistono le monografie di Farmacopea e per i generici, spesso prodotti in India e Cina, non sono ancora stati fatti studi approfonditi sulla qualità, la stabilità e la bioequivalenza. Il Dipartimento del Farmaco dell'ISS è già da anni impegnato nello studio della problematica della contraffazione farmaceutica a livello europeo e, nell'ultimo anno, si è ampliato lo studio alla problematica nei PVS mediante la messa a punto di un unico metodo analitico per il dosaggio dei principali antimalarici e l'analisi di campioni reperiti sul mercato informale nei PVS. I risultati sono stati presentati a convegni scientifici internazionali e inviati alla pubblicazione.

Questo progetto si propone di sviluppare e validare metodi analitici semplici e versatili per il controllo di qualità di alcuni antimalarici, antitubercolari e ARV al fine di fornire metodiche strumentali utilizzabili nei PVS per il controllo di qualità dei farmaci e di verificare la qualità dei farmaci venduti sul mercato informale nei PVS, che saranno reperiti tramite la collaborazione con Organizzazioni non Governative.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo e validazione di metodi di Cromatografia Liquida (LC) semplici e versatili per l'identificazione e il dosaggio simultaneo del/i principi attivi e principali impurezze di antimalarici, antitubercolari e ARV in prodotti commerciali generici (*unbrande* e *semi-brande*) e *brande* a singolo principio attivo e in *fixe-dose combination* tra i quali: a) antimalarici a base di Cloroquina, Chinina, Meflochina, Sulfadoxina/Pyrimetamina; b) antitubercolari a base di Rifampicina/Pyrazinamide/Isoniazide, Rifampicina/Isoniazide; c) ARV a base di Nevirapina/Stavudina/Lamivudina; Zidovudina/Lamivudina.

Sviluppo e validazione del Test di Dissoluzione *in vitro* delle forme solide di dosaggio per avere uno strumento analitico atto a confrontare il profilo di rilascio tra i prodotti a singolo principio attivo e quelli in *fixe-dose combination*, contenenti più principi attivi, sia *brande* che generici degli stessi farmaci, al fine di evidenziare le possibili problematiche di bioequivalenza dei prodotti in commercio nei PVS.

Applicazione dei metodi LC e di Dissoluzione all'analisi di alcuni prodotti *brande* e di campioni di prodotti reperiti sul mercato informale in Angola, Burundi, Congo, Brasile, Sud-Est Asiatico al fine di valutare la diffusione del fenomeno della contraffazione farmaceutica.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

Possibile utilizzo dei metodi sviluppati da parte dei laboratori nei PVS al fine di valutare la qualità dei farmaci ivi venduti.

Valutazione della diffusione del fenomeno della contraffazione e della presenza di farmaci sub-standard nei PVS.

Evidenziare, mediante gli studi di Dissoluzione, le eventuali problematiche di bioequivalenza tra farmaci brande e generici e tra quelli a singolo principio attivo e quelli in fixe-dose combination venduti nei PVS.

Le informazioni sulla qualità dei farmaci ivi venduti permetteranno la maggiore comprensione della mancanza di efficacia di molte terapie farmacologiche reali rispetto ai Trials clinici nei PVS.

T20-QoL: studio multicentrico osservazionale, per la valutazione della qualità della vita in pazienti con infezione da HIV sottoposti a terapia antiretrovirale contenente Enfuvirtide (T-20)

Il progetto è coordinato dal reparto di farmacologia e terapia delle malattie da virus, presso il Dipartimento del Farmaco dell'ISS, e dalla IV Divisione Malattie Infettive dell'IRCCS Spallanzani di Roma.

Negli ultimi anni, tra i clinici e i ricercatori impegnati nel trattamento della malattia da HIV si è sviluppato un interesse crescente verso lo studio e il monitoraggio della qualità della vita delle persone HIV-positivo. Un aspetto di fondamentale importanza è quello relativo all'impatto del trattamento antiretrovirale sulla qualità della vita.

Il T-20 (enfuvirtide) è il primo antiretrovirale appartenente a una nuova classe di sostanze anti-HIV: gli inibitori della fusione. Recenti studi hanno dimostrato una notevole efficacia di questa molecola su pazienti in fallimento terapeutico, in assenza di opzioni terapeutiche alternative.

L'enfuvirtide, disponibile solo per via parenterale, va somministrata sottocute due volte al giorno. L'inoculazione può talvolta associarsi a reazioni locali, spesso dolorose anche se di entità lieve o moderata. L'obiettivo di questo progetto è pertanto l'analisi dell'impatto che un regime contenente Enfuvirtide può avere sulla qualità della vita del paziente, soprattutto in ragione di tali osservazioni. È infatti ipotizzabile che il disagio legato alle particolari modalità di somministrazione, specie se associate a reazioni locali, possano influire negativamente sulle condizioni psico-fisiche del paziente e comprometterne la qualità di vita.

Risultati attesi nel triennio

È prevista l'analisi di dati relativi ad un campione di circa 100 pazienti. Si prevede di raccogliere informazioni, tramite alcuni centri clinici italiani di malattie infettive, sulle caratteristiche dei pazienti in trattamento, sulla risposta al trattamento, sulla tollerabilità del farmaco, sulla valutazione della qualità della vita sia in termini di monitoraggio che come valutazione farmaco-economica.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni raccolte permetteranno di contribuire alla definizione di tollerabilità del farmaco tramite la valutazione della qualità della vita in pazienti sottoposti a terapia con T-20.

Un approccio multidisciplinare allo studio delle proprietà di stato solido di farmaci di uso consolidato: nuovi studi strutturali e dinamici mediante FT-IR con ATR universale e Risonanza Magnetica Nucleare di stato solido con CP/MAS

Lo scopo del progetto è studiare le possibili varianti di stato solido di principi attivi farmaceutici di consolidato e largo uso terapeutico, per i quali una occorrenza di fenomeni di polimorfismo, amorfismo, pseudopolimorfismo e solvatazione possa avere un effetto sulle caratteristiche biofarmaceutiche e tecnologiche del prodotto finito. Infatti è noto che le proprietà di stato solido dei farmaci 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 uso consolidato e largo uso terapeutico utilizzati in forme farmaceutiche solide, per le quali è possibile la presenza o coesistenza di forme cristalline diverse in formulazioni aventi medesima composizione come nel generico e nel corrispondente originatore. Lo studio verrà affrontato seguendo un approccio multidisciplinare e facendo ricorso a tecniche calorimetriche e spettroscopiche. Il gruppo di ricerca ha già pubblicato numerosi articoli utilizzando le più classiche tecniche quali DSC, TGA, FTIR e diffrazione ai raggi X su polvere. Nuovi studi strutturali e dinamici verranno condotti utilizzando la spettroscopia FT-IR con ATR universale in controllo di temperatura e la Risonanza Magnetica Nucleare allo stato solido con CP/MAS. Inoltre verranno effettuati studi sulla stabilità fisica delle varie forme sottoposte a *stress* termici e meccanici e sulla granulometria delle polveri, per l'importanza che questi parametri possono avere sulla solubilità e biodisponibilità del principio attivo. Infine verranno utilizzate tecniche per l'accertamento della cessione del principio attivo da forme farmaceutiche solide.

Risultati attesi nel triennio

La letteratura, sia scientifica che ufficiale è spesso carente per quanto riguarda gli aspetti di stato solido dei principi attivi di uso consolidato o troppo datata (si tratta in genere di prodotti registrati 20 anni fa) e quindi inadeguata alle attuali conoscenze e allo sviluppo tecnologico dei nuovi mezzi di indagine. Pertanto per quanto riguarda gli aspetti legati alla caratterizzazione chimica, l'uso consolidato di un principio attivo non è una garanzia che questo sia esaurientemente indagato.

Il principale risultato atteso è migliorare la conoscenza delle caratteristiche chimico-fisiche e delle proprietà di stato solido di principi attivi farmaceutici di uso consolidato in relazione all'influenza che queste possono avere sulla qualità dei prodotti generici attraverso la pubblicazione dei risultati ottenuti su riviste internazionali.

Inoltre le autorità regolatorie richiedono, per la definizione delle specifiche di una nuova sostanza farmaceutica mai immessa sul mercato, una completa caratterizzazione chimico-fisica e l'adozione di procedure analitiche per la determinazione delle possibili varianti di stato solido. Ulteriore obiettivo è quindi sensibilizzare le autorità regolatorie all'importanza della completa caratterizzazione dei principi attivi anche di uso consolidato e alla definizione di linee-guida per i requisiti minimi delle "*existing active substances*" che tengano conto anche degli aspetti di stato solido.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio assume una notevole rilevanza per la salute pubblica in relazione alle problematiche inerenti all'immissione nel mercato europeo di prodotti generici a base di principi attivi di uso consolidato, ma di fonte extra europea, spesso privi di una adeguata caratterizzazione delle proprietà di stato solido.

Valutazione dell' efficacia e della sicurezza della terapia antiretrovirale in un paese con risorse limitate

La terapia antiretrovirale di combinazione (HAART) ha cambiato drammaticamente la storia naturale dell'infezione da HIV nei paesi industrializzati. Gli alti costi e la carenze di infrastrutture hanno limitato fino ad ora la disponibilità della HAART nei paesi con risorse limitate. Recentemente grazie al Fondo Globale per HIV, Malaria e Tubercolosi i programmi di somministrazione di farmaci antiretrovirali vengono implementati su larga scala. Alcuni studi hanno dimostrato che la terapia antiretrovirale in questi contesti può avere una efficacia clinica e immunologica comparabile a quella ottenibile nei paesi industrializzati. Pochi dati sono invece disponibili sugli aspetti che possono rappresentare degli ostacoli al successo terapeutico a lungo termine: la tollerabilità e la sicurezza dei farmaci antiretrovirali (in considerazione dell'aumentata frequenza di patologie concomitanti quali tubercolosi e malaria), l'aderenza al trattamento e il possibile sviluppo di resistenze virali.

Verrà condotto uno studio clinico prospettico presso la Clinica di Malattie Infettive dell'Università di Mbarara (Uganda).

Lo studio prevede l'arruolamento di 200 pazienti con infezione da HIV che iniziano una terapia antiretrovirale. I pazienti verranno seguiti con visite mensili per il *follow-up* clinico e con valutazione trimestrale dei parametri di laboratorio. Lo studio avrà una durata complessiva di 18 mesi.

Risultati attesi nel triennio

Determinare il tipo, la frequenza, e i possibili predittori degli effetti tossici associati con l'uso di una terapia HAART nell'Africa subsahariana (verrà valutata l'incidenza di anemia, di epatotossicità, di alterazioni della funzione renale e pancreatica e la possibile insorgenza di neuropatie periferiche)

Studiare l'effetto della terapia antiretrovirale sul metabolismo lipidico e sulla possibile insorgenza di lipodistrofia (verrà valutato l'effetto della terapia antiretrovirale sul livello di trigliceridi e colesterolo e il possibile impatto sull'aspetto fisico dei pazienti)

Misurare l'aderenza ai regimi antiretrovirali. Identificare le ragioni di una mancata aderenza (ai pazienti verrà somministrato un questionario semplificato per rilevare l'assunzione dei farmaci, nello stesso questionario il paziente potrà riportare le eventuali difficoltà nella assunzione dei farmaci)

Determinare la frequenza di emergenza di ceppi virali resistenti durante il trattamento antiretrovirale (con cadenza semestrale verrà effettuata la determinazione dell'HIV-RNA e nei pazienti che presentano un fallimento virologico verrà effettuato un test di resistenza genotipico; verrà studiata la correlazione tra aderenza e insorgenza di resistenza)

Trasferibilità dei risultati

I dati sulla tossicità dei farmaci antiretrovirali nei Paesi in via di sviluppo sono molto limitati. Le informazioni raccolte potranno essere molto utili in considerazione del fatto che i programmi di accesso alla terapia antiretrovirale saranno sempre più frequentemente implementati e che la maggioranza dei pazienti verrà seguita in situazioni che permettono un monitoraggio limitato.

L'identificazione dei pazienti a differenti livelli di rischio potrà identificare sottogruppi di pazienti che richiedono diverse intensità di monitoraggio. L'obiettivo finale è quello di stabilire il livello minimo di indagini di laboratorio richieste in un contesto con risorse limitate.

Valutazione dell'impatto della prevenzione secondaria sulla sopravvivenza in soggetti affetti da infarto del miocardio: identificazione di fattori predittivi

Attualmente in Italia il peso complessivo delle malattie cardiovascolari sul totale dei decessi è pari al 44%, di cui il 30% è dovuto all'infarto del miocardio e il 31% all'ictus: ogni anno circa 36 mila persone muoiono a causa di infarto acuto del miocardio.

Nonostante, le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte, tuttavia si è osservato un *trend* in diminuzione della mortalità di queste patologie, che può essere attribuito al relativo miglioramento della sopravvivenza dei casi affetti da infarto del miocardio correlato con l'impatto delle strategie terapeutiche in prevenzione secondaria, attraverso l'uso di aspirina, trombolitici, anti ipertensivi e statine.

In questo scenario, dove gli approcci terapeutici sono molteplici, e soprattutto i fattori di rischio per un ricorrente evento ischemico coronario possono essere diversi, appare importante indagare con attenzione le interazioni tra fattori biologici e l'uso di diversi approcci farmacologici al fine di valutare a lungo termine i fattori prognostici e terapeutici favorenti una lunga sopravvivenza in soggetti con Infarto Acuto del miocardio.

Obiettivi di questo studio sarà di:

Valutare l'impatto delle diverse strategie terapeutiche comunemente utilizzate nel governo clinico dei pazienti con Infarto Acuto del Miocardio in termini di sopravvivenza.

Identificare polimorfismi genici che influenzino una diversa risposta farmacologica

Identificare differenti profili di rischio per un ricorrente evento ischemico e individuare il migliore approccio terapeutico

Lo studio si baserà su uno studio osservazionale della durata di due anni e saranno inclusi i pazienti con Infarto Acuto del Miocardio in trattamento presso le strutture del SSN.

Risultati attesi nel triennio

L'indicatore principale dello studio sarà espresso tramite la stima in termini di sopravvivenza dei soggetti inclusi nello studio per differenza di strategia farmacologica e pertanto nei termini di mortalità.

Si attende di identificare diversi gruppi di popolazione, in relazione a una differente stima di sopravvivenza dei pazienti inclusi nello studio dopo la sindrome coronarica acuta. Questi differenti gruppi di popolazione saranno analizzati al fine di categorizzarli sulla base dell'individuazione di fattori predittivi che influenzino la risposta farmacologica, quali caratteristiche sociodemografiche, in particolare classi di età e sesso, quadro clinico e pertanto patologie concomitanti, e caratteristiche biologiche, quali polimorfismi genici. Particolare attenzione sarà rivolta alla valutazione di eventuali diversità in termini di differenza uomo-donna, tenendo conto della differente risposta farmacologica attesa.

Sarà tenuto conto anche del percorso assistenziale che il singolo paziente seguirà in fase post-infartuale. Questo permetterà di valutare i diversi approcci farmacologici e di correlarli con la dimensione/organizzazione di livello delle strutture del Sistema Sanitario Nazionale che prenderanno in carico il singolo paziente infartuato.

Trasferibilità dei risultati

Le patologie cardiovascolari sono al primo posto per mortalità e per morbidità nel nostro paese ma spesso l'approccio clinico corrente non tiene conto di fattori che influenzino fortemente la risposta clinica. La principale finalità della seguente linea di ricerca è quella dell'individuazione di fattori individuali e di popolazione che siano predittivi di una efficace risposta clinica. Lo scopo generale è di migliorare l'approccio diagnostico e l'appropriatezza della terapia in pazienti con infarto acuto del miocardio con differenze ergo-biologiche e fattoriali di popolazione. Saranno definiti approcci diagnostici multidisciplinari, che includano analisi epidemiologiche di fattori di

popolazione, e studi di farmacogenomica dei polimorfismi genici coinvolti nella risposta farmacologica al trattamento in profilassi secondaria.

Valutazione preclinica dei farmaci

I potenziali effetti tossici di nuovi farmaci rappresentano un crescente motivo di preoccupazione e sono la causa spesso dell'interruzione dello sviluppo di un farmaco o del suo ritiro dal mercato. Negli ultimi anni infatti, una serie di farmaci sono stati tolti dal mercato o hanno richiesto speciali avvertenze nei foglietti illustrativi (*black box*) in seguito all'insorgenza di effetti avversi osservati dopo la registrazione. Le differenze di specie utilizzate negli studi di sicurezza preclinica, la mancanza o la insufficiente sensibilità di biomarcatori efficaci, e in alcuni casi la non rappresentatività della popolazione target negli studi clinici pre registrazione, sono probabilmente fra le principali cause dei fallimenti nella previsione di potenziali effetti tossici per l'uomo. Una delle maggiori sfide nello sviluppo del farmaco è l'accuratezza della valutazione della tossicità del farmaco per l'uomo, processo che oltre a risorse, richiede la disponibilità di tutti gli operatori coinvolti, sia appartenenti alle settore produttivo che a quello regolatorio, a far evolvere la tossicologia da pratica empirica a disciplina investigativa, mediante la definizione e la valutazione di pattern tossicologici chiave e dei corrispondenti fattori di rischio

Risultati attesi nel triennio

La proposta di attività in questo settore ha fra gli obiettivi principali quello di creare le premesse operative e formative per revisionare la pratica *standard* di valutazione introducendo la capacità di analizzare e/o di richiedere studi meccanicistici in aggiunta alle più comune determinazione dei fattori di rischio basata esclusivamente sulla relazione dose risposta. Fornire e diffondere procedure e approcci mirati all'identificazione non solo dei fattori di rischio strettamente correlati alle caratteristiche intrinseche del farmaco, ma anche quelli potenzialmente influenti quali fattori ambientali (co-somministrazione di farmaci e cibo), fisiologici (età, sesso malattie concomitanti), genetici (polimorfismi del sistema MFO, disordini metabolici, modulazione dei sistemi immunitari). Tale attività prevede approcci multidisciplinari sia sperimentali che valutativi, di seguito riportati.

Caratterizzazione di modelli *in vitro* e *in vivo* interspecie, che consentano di valutare l'attività funzionali della P-glicoproteina (P-gp) associata a quella del citocromo P 450 (CYP), sistemi in grado di interagire parzialmente per lo stesso substrato (farmaco) e influenzarne l'assorbimento, il metabolismo e l'eliminazione.

Studio di fattibilità per la costruzione di un data base tossicologico relativo a dati non clinici e clinici di danno epatico precoce in seguito a somministrazione di prodotti medicinali.

Attività di valutazione di *dossier* non clinici e di revisione e formulazione di linee guida.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle indagini proposte sulle attività di sistemi enzimatici e metabolici coinvolti nei meccanismi d'azione dei farmaci possono contribuire alla comprensione dei meccanismi d'azione alla base di effetti nocivi dei farmaci, nonché per l'individuazione di eventuali biomarcatori di tossicità

Il processo di valutazione, la cui complessità è andata aumentando in modo direttamente proporzionale alla mole di dati (mirati a fornire informazioni sulla composizione e sui meccanismi di attività ed eventuale tossicità), necessari alla registrazione dei farmaci, si avvale positivamente dell'aggiornamento continuo di coloro che hanno, nell'ambito dell'Autorità Sanitaria competente, la responsabilità delle valutazioni dei prodotti medicinali. Tali sforzi potranno aiutare infatti ad espandere la cooperazione e il trasferimento di informazioni fra gli esperti coinvolti nell'intero processo di sviluppo e registrazione di un farmaco, nonché a sviluppare strategie volte ad incrementare la predittività dei modelli di sicurezza preclinica

**Dipartimento
Farmaco**

Attività di controllo, valutazione, parere

Accertamenti ispettivi relativi a BPL e GMP (materie prime)

Ispezioni volte alla verifica della conformità ai principi della Buona Pratica di Laboratorio (BPL), in accordo al DL.vo 120/1992. Nell'ambito di questa attività, due esperti del Dipartimento partecipano alle Riunioni della Commissione Nazionale per le BPL (Numero medio di sedute/anno: 11). Inoltre uno degli esperti, con la nomina di Ispettore, svolge attività di controllo di conformità alle BPL nei centri di saggio italiani (numero di ispezioni medie annue:8) ed eventualmente, su richiesta, anche in centri con sede in Paesi dell'OCSE.

In relazione all'attività GMP, due esperti del Dipartimento sono inseriti nella lista di ispettori nazionali e svolgono in media 12 ispezioni annue ciascuno, in siti di produzione di materie prime, uno dei due esperti ha svolto attività anche in siti di produzione extraeuropei (India). Gli stessi due esperti hanno partecipato ad un corso GMP organizzato dalla SPI (Boston, USA) nell'ottica di una sempre maggiore formazione e aggiornamento.

Piano triennale

BPL: Si prevede il proseguimento di questa attività con 11 riunioni annue della Commissione e circa 8 ispezioni annuali.

GMP: Si prevede il proseguimento di questa attività con la possibilità di ispezione anche a siti di produzione di prodotto finito.

Aggiornamento tabelle stupefacenti ai sensi del DPR 309/90. Pareri per il Ministero della Salute, quesiti posti da Prefetture, ASL, altre Amministrazioni dello Stato

Il DPR 309/90, o Testo Unico in materia di stupefacenti e tossicodipendenze, prevede espressamente che il Ministero della Salute, cui spetta il compito di aggiornare le tabelle delle sostanze stupefacenti e psicotrope, ogni volta acquisisca formalmente il parere dell'Istituto Superiore di Sanità. 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 10 pratiche.

Piano triennale

Si prevede di mantenere invariato il numero di pratiche fino ad ora evaso.

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 C.d.S. (D.L. 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 27/06/03 e alla predisposizione delle proposte di protocolli attuativi del Febbraio 2005. È possibile infine che all'ISS venga richiesta la valutazione di nuovi dispositivi diagnostici per la rilevazione di stupefacenti nei fluidi biologici di conducenti.

Piano triennale

Nel prossimo triennio si prevede un'attività in relazione all'evoluzione della normativa e degli specifici protocolli attuativi.

Autorizzazione ai protocolli di sperimentazione animale (DL.vo 116/1992)

Esame dei protocolli sperimentali, che prevedono l'utilizzo di animali, in accordo al DL.vo 116/1992, di competenza del Dipartimento del Farmaco, da laboratorio, per la deroga all'uso dell'anestesia e l'impiego di primati non umani. Tale attività comporta la formulazione del parere in base al quale la Direzione generale competente del Ministero della Salute rilascia l'autorizzazione all'esecuzione della sperimentazione. Numero medio di pareri espressi/anno: 60

Piano triennale

In comparazione dell'attività precedentemente svolta, si prevede di mantenere un livello di attività di circa 60 pratiche l'anno.

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: 10.

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 (EMEA)

Il Dipartimento svolge una consistente attività di consulenza tecnico-scientifica altamente qualificata, per l'Agenzia Europea del Farmaco (EMEA, Londra). Il Direttore del Dipartimento è stato infatti nominato membro di due importanti Gruppi di lavoro dell'Agenzia stessa e precisamente: lo *Scientific Advisory Group for HIV/Viral Diseases* (SAG) e inoltre come membro dello *Scientific Advice Working Party* (SAWP) che ha il ruolo rilevantissimo di fornire supporto scientifico, in particolare per lo sviluppo di nuove terapie. Quest'attività comporta in media 12-15 riunioni della durata di 2-3 giorni a Londra e l'esame di circa 10 richieste di supporto scientifico l'anno.

Altri esperti del Dipartimento partecipano ad ulteriori gruppi di lavoro tecnici dell'EMEA e precisamente al *Pharmacovigilance Working Party* (PhWP - Numero medio di sedute/anno: 11)- *Efficacy Working Party* (EWP- Numero medio di sedute/anno: 6), *Safety Working Party* (SWP - Numero medio di sedute/anno:3). 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

Tutte le attività sopra descritte si prevede vengano mantenute e incrementate, per il prossimo triennio 2006-2008, in relazione alle richieste sempre più numerose di queste tipo che vengono presentate all'EMEA.

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 integratori alimentari o di preparazioni ad uso cosmetico o con finalità salutistiche. Tale attività comporta l'esame di circa 6 pratiche l'anno.

Piano triennale

Si prevede il mantenimento di quest'attività con un impegno non variato rispetto a quanto descritto.

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 viene svolta in questo ambito anche per la valutazione di aspetti di qualità e sicurezza pre-clinica dei farmaci ammessi alla sperimentazione di fase I, in accordo al DPR 439/2001 e al DL.vo 211/2003.

Piano triennale

Tutte le attività suddette proseguiranno per il prossimo triennio e i numeri di intervento saranno probabilmente superiori a 600, visto la crescita delle richieste agli esperti del Dipartimento. Parte di tale attività rientrerà anche in quelle previste dalla Convenzione ISS-AIFA.

Controllo e valutazione di prodotti provenienti da sequestri e dalla Magistratura nel settore delle sostanze stupefacenti e psicotrope

A questo Istituto pervengono richieste di accertamenti su prodotti sequestrati dai NAS e provenienti da Procure. La ricerca della eventuale presenza di sostanze tabellate, su prodotti destinati ad uso farmacologico, alimentare o altro, rientra nelle specifiche competenze del 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.

Vigilanza sui laboratori preposti al controllo sanitario dell'attività sportiva

L'ISS come previsto dal DM 13 aprile 2001, GU n. 105 del 08/05/01, 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 e probabilmente incrementata per il prossimo triennio 2006-2008.

**Dipartimento
Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate**

Attività di ricerca

Disgregolazione del sistema immunitario: analisi dei meccanismi cellulari che intervengono nelle patologie autoimmuni e da allergia

Scopo dello studio è quello di definire il fenotipo delle cellule T *helper* (Th) messe a contatto con dendritiche precedentemente trattate con il diltiazem. Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio ci mostrano una deviazione dal fenotipo Th1 a favore di un fenotipo di tipo Th2 o Th0. L'esperienza di O'Garra et al. sull'induzione di cellule T regolatorie produttrici di IL-10 dopo trattamento *in vitro* con vitamina D3 e desametasone di cellule T *naive* stimulate con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, con e senza anticorpi anti-citochine, ci ha spinti a sviluppare come primo obiettivo lo studio sull'effetto diretto del diltiazem sulle cellule T. A questo proposito sono state allestite delle linee cellulari T, a partire da cellule umane CD4+CD45+ che sono state stimulate per tre volte a distanza di una settimana, in presenza di diltiazem 10-4M. Ogni settimana, prima della stimolazione successiva, il supernatante delle culture è stato collezionato e sottoposto al dosaggio delle citochine tramite ELISA, per la determinazione del fenotipo delle cellule. Al contrario dei risultati ottenuti dal gruppo di O'Garra, non abbiamo registrato un aumento della produzione di IL-10, che anzi tende a diminuire. Il risultato più rilevante è che il diltiazem esprime un potente effetto anti-infiammatorio con una diminuzione della produzione sia di INF-gamma che di IL-6. Il livello di IL-4, determinato alla fine delle colture con *staining* intracitoplasmatico in quanto non rilevabile con il metodo ELISA, sembra non subire alcuna variazione, mentre non risulta ancora chiaro un possibile aumento dell'IL-5.

Risultati attesi nel triennio

Tale studio verrà sviluppato nel prossimo anno con una più precisa definizione dell'effetto del diltiazem sul fenotipo delle cellule Th. A questo proposito si studierà più approfonditamente l'effetto delle cellule dendritiche trattate con il diltiazem su cellule T naive per studiare il fenotipo delle linee che ne derivano, con particolare interesse per la produzione di IL-5 e IL-13.

Trasferibilità dei risultati

Il diltiazem è un farmaco ampiamente usato in clinica, sia in cardiologia che in alcuni protocolli di immunosoppressione dopo trapianto di rene. È perciò di fondamentale importanza definire più chiaramente gli effetti sulle cellule del sistema immunitario

Valutazione dell'apoptosi e produzione di citochine pro-infiammatorie e regolatorie in risposta all'azatioprina: studio *in vitro* in pazienti con IBD responders e non responders al farmaco

L'efficacia terapeutica dell'azatioprina nel trattamento della fase di attività clinica e nel mantenimento della remissione nelle IBD è stata dimostrata in studi clinici controllati su pazienti adulti e nell'età pediatrica. Tuttavia in circa la metà dei pazienti con malattia clinicamente attiva e in circa un terzo di quelli in remissione, il trattamento risulta inefficace. La mancanza di un *test in vitro* che permetta la valutazione della sensibilità al farmaco obbliga alla somministrazione del farmaco stesso, con successiva ricerca individualizzata della dose efficace associata inevitabilmente alla comparsa, in una parte di pazienti, di reazioni di tossicità includenti pancreatite acuta, epatite, fibrosi epatica e mielosoppressione. Recentemente è stato dimostrato che l'azatioprina è in grado di modulare *in vitro* l'apoptosi da attivazione dei linfociti T di soggetti normali e pazienti con IBD e che un simile effetto si osserva nei linfociti isolati da sangue periferico e dalla mucosa intestinale di pazienti con IBD trattati *in vivo* con azatioprina. Scopo dello studio è quello di verificare la possibilità che la capacità dell'azatioprina di indurre apoptosi *in vitro* in linfociti isolati da pazienti non in trattamento, ma dei quali è nota la risposta al farmaco, correli con la sensibilità al farmaco.

Risultati attesi nel triennio

Validazione delle variazioni di apoptosi indotte dall'azatioprina come espressione di efficacia del farmaco

Possibile individuazione di fenotipi con diversa produzione di citochine e loro variazione a seguito del trattamento *in vitro* con azatioprina espressione di sensibilità o resistenza al farmaco.

Trasferibilità dei risultati

Messa a punto e validazione di *test* predittivi della risposta al farmaco

Epidemiologia molecolare e monitoraggio della toxoplasmosi congenita in Italia

Il progetto si basa sull'attività svolta presso l'ISS in un arco di 10 anni sulla diagnosi prenatale della toxoplasmosi. Durante questo periodo sono stati identificati circa mille casi di sieroconversione per toxoplasmosi in gravidanza per i quali sono state archiviate informazioni riguardanti la definizione di caso, la risposta anticorpale, e le informazioni sulla eventuale trasmissione fetale. Durante questo periodo è stata allestita una sieroteca e una criobanca di ceppi di *Toxoplasma* per la prima volta isolati in Italia. I ceppi isolati saranno utilizzati per studi di tipizzazione molecolare miranti all'individuazione dei genotipi circolanti in Italia e alla loro correlazione con il quadro clinico e patologico indotto nel neonato, in particolare per individuare marcatori di trasmissione verticale e di patologia neonatale. Particolare attenzione sarà posta alla identificazione di genotipi misti che per *pattern* molecolare siano riconducibili a prodotti di ricombinazione genica tra i genotipi noti. Il progetto prevee inoltre la ricerca di nuovi *marker* molecolari e la prosecuzione del monitoraggio dell'infezione in gravidanza e delle eventuali trasmissioni verticali.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono:

Identificazione dei genotipi di *Toxoplasma gondii* circolanti in Italia;

Identificazione della patogenicità dei ceppi e valutazione del rischio di trasmissione verticale ad esso correlato;

Identificazione dei marcatori molecolari di virulenza e risposta anticorpale del paziente. Particolare importanza hanno, a questo proposito, i casi, seppur rari, di risposta immunitaria criptica: casi in cui la presenza del parassita è dimostrata dai *test* di ricerca diretta benché siano caratterizzati da bassissimi livelli anticorpali.

Trasferibilità dei risultati

Workshop per promuovere la discussione tra ginecologici, infettivologi e neonatologi sulla diagnostica e terapia alla luce dei risultati ottenuti;

Organizzazione di un corso accreditato rivolto agli operatori in ginecologia e ostetricia operanti nell'ambito del SSN per promuovere la formazione sull'argomento del progetto;

Produrre e diffondere pubblicazioni scientifiche a livello nazionale, come materiale informativo per gli operatori del SSN;

Pubblicazioni scientifiche di valenza internazionale

Studio e prevenzione della trasmissione interspecie dei virus influenzali

Alcune specie animali suscettibili all'infezione da parte di virus influenzali giocano un ruolo determinante nell'emergenza di pandemie influenzali nell'uomo. Il passaggio all'uomo di virus influenzali potenzialmente pandemici può avvenire o attraverso fenomeni di riassortimento genetico in ospiti intermedi (specie suina), come avvenuto in occasione delle pandemie del 1957 e del 1968, ovvero in seguito al passaggio diretto all'uomo di virus aviari. Particolare allarme in

questo senso hanno destato i casi di infezione umana da virus H5N1 del pollo, verificatisi nel sud-est asiatico negli ultimi anni.

In Italia gli allevamenti avicoli del Veneto e della Lombardia sono periodicamente colpiti da virus influenzali appartenenti ai sottotipi H5N2, H7N1 e H7N3. I dati epidemiologici relativi alla progressione dei focolai sul territorio farebbe ipotizzare un collegamento tra virus circolanti in uccelli acquatici migratori e allevamenti avicoli in alcune zone della provincia di Brescia, particolarmente ricche di acque.

Lo studio riguarderà i virus influenzali circolanti in alcune specie aviarie, con particolare riferimento a quelle selvatiche migratrici (folaghe, germani reali e altri anatidi) svernanti in Italia.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso è quello di isolare e riprodurre stipiti influenzali aviari circolanti in alcune specie aviarie selvatiche svernanti nel nostro Paese. Sui virus isolati si procederà a una prima identificazione sottotipo-specifica delle proteine virali di superficie, che costituirà il presupposto per ulteriori eventuali studi filogenetici finalizzati alla comprensione dei rapporti evolutivi esistenti tra virus umani e virus di diversa origine animale e alla valutazione del loro potenziale pandemico.

Inoltre sarà possibile individuare i fattori di rischio ambientale associati alla comparsa di nuovi virus negli allevamenti avicoli italiani.

L'obiettivo finale del contributo di questa Unità Operativa sarà dunque finalizzato alla prevenzione dell'emergenza di pandemie influenzali nella popolazione umana da focolai di origine animale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto saranno resi disponibili a livello nazionale e internazionale, attraverso pubblicazioni scientifiche, partecipazioni a *workshop* e seminari. I dati scaturiti dalle ricerche saranno condivisi con le strutture veterinarie responsabili a livello territoriale e nazionale (IZS di Padova), nonché messi a disposizione del Centro per il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute.

Accelerated atherosclerosis in End Stage Renal Disease

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di mortalità nei pazienti con patologia renale allo stadio finale (ESRD). Numerose evidenze suggeriscono che lo *stress* ossidativo presente in molti pazienti con ESRD è coinvolto in processi che causano aterosclerosi accelerata. Si ritiene che le modificazioni proteiche causate dallo *stress* ossidativo e consistenti nella formazione di prodotti di ossidazione e glicazione avanzata siano coinvolte nello sviluppo delle placche aterosclerotiche, però non esistono dati a riguardo nei pazienti con ESRD. L'interazione dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) con il loro recettore (RAGE) espresso su vari tipi cellulari inclusi monociti, macrofagi e cellule endoteliali induce risposte cellulari che potrebbero contribuire all'infiammazione. È noto inoltre che gli AGEs possono essere immunogenici e causare la formazione di autoanticorpi. Recenti evidenze indicano che gli ormoni leptina e grelina che influenzano il metabolismo e hanno una funzione immunoregolatoria presentano livelli alterati nei pazienti con ESRD, ma il loro ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi accelerata non è noto. Alla luce di quanto detto il progetto di ricerca si propone di approfondire il ruolo sia della risposta immune verso antigeni autologhi modificati e sia di ormoni immunoregolatori quali leptina e grelina nella patogenesi dell'aterosclerosi accelerata in pazienti con ESRD.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso, qualora venissero individuati autoantigeni implicati in fenomeni autoimmuni in pazienti con aterosclerosi accelerata associata ad ESRD, è la validazione dell'ipotesi eziopatogenetica autoimmune per l'aterosclerosi in tali pazienti. Un secondo risultato è l'acquisizione di nuove conoscenze fisiopatologiche riguardo specifici meccanismi immunologici soprattutto per quanto concerne i meccanismi immunoregolatori. In particolare lo studio porterebbe a una maggiore conoscenza del ruolo che ormoni immunoregolatori quali leptina e grelina svolgono nell'ESRD. Un altro importante risultato è la messa a punto di strategie *in vitro* di immunomodulazione mediante utilizzo di farmaci od ormoni immunomodulanti.

Trasferibilità dei risultati

Il trasferimento applicativo nella pratica clinica delle conoscenze acquisite consisterebbe nello sviluppo di nuovi strumenti biologici di intervento preventivo e riparativo che interferiscano con meccanismi putativi del danno vascolare in pazienti con ESRD. Terapie innovative con immunomodulanti, con particolare riguardo ad ormoni con funzione metabolica e immunoregolatoria quali leptina e grelina, potrebbero determinare una riduzione della mortalità associata ad aterosclerosi accelerata nei pazienti con ESRD.

Agenti virali quali possibili cause di esacerbazioni della bronchite

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e le sue riacutizzazioni rappresentano una delle principali cause di morbidità e mortalità nel mondo. Nonostante le esacerbazioni acute della BPCO siano una causa frequente di ospedalizzazione, il loro meccanismo non è stato ancora chiarito. Molte esacerbazioni della BPCO sono dovute non solo ad infezione batterica, ma anche a infezioni virali del tratto respiratorio superiore. I virus maggiormente implicati sono virus influenzali e parainflenzali, picornavirus, adenovirus e virus respiratorio sinciziale.

La presente ricerca si propone di monitorare la presenza di virus in campioni di espettorato selezionati da pazienti ospedalizzati per esacerbazioni acute di BPCO. Lo studio sarà condotto in due fasi: l'osservazione diretta al M.E., permettendo di visualizzare i virus contenuti nel campione, potrà mettere in evidenza l'eventuale presenza di virus diversi da quelli sopra riportati e potrà fornire indicazioni utili per la ricerca specifica di virus respiratori tramite tecniche molecolari, che costituisce la seconda fase dello studio.

Risultati attesi nel triennio

Il presente programma permetterà lo sviluppo di nuovi strumenti molecolari (RT-PCR *multiplex* e *Real-Time* PCR) per la diagnosi rapida di infezione da virus dell'Influenza di tipo A, sottotipi H1N1 e H3N2, dell'Influenza di tipo B e del Virus Respiratorio Sinciziale (RSV) di tipo A e B, su campioni clinici prelevati dai pazienti ospedalizzati. Per la diagnosi rapida di infezione da adenovirus, rinovirus, echovirus e altri picornavirus verranno utilizzate le tecniche di RT-PCR con *primers* specifici e saranno messe a punto tecniche di *microarray* che sono molto rapide, sensibili e specifiche.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto saranno utilizzati per l'elaborazione di pubblicazioni scientifiche e messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale anche attraverso partecipazione a *workshop* e seminari.

Analisi dell'attività immunomodulante di lipidi e glicolipidi endogeni indotti in seguito ad infezione o stimolazione con agenti di natura microbica

Strutture di natura microbica sono riconosciute da recettori dell'immunità innata quali recettori denominati *pattern recognition receptors* (PRRs) che sono in grado di promuovere una cascata di eventi che hanno come effetto finale quello di attivare e dirigere la risposta dei linfociti T e B. PRRs riconoscono molecole di natura microbica conservate denominate PAMPs (*Pathogens associated molecular pattern*), che sono componenti strutturali di microorganismi. Tuttavia, esiste anche una lista crescente di ligandi di natura endogena con proprietà immunomodulanti che si legano agli stessi recettori dei PAMPs e che possono essere indotti in seguito a stimoli di natura microbica e non. Tra le modificazioni che possono avvenire nelle cellule in seguito all'infezione e/o interazione con microbi o prodotti microbici, è stata osservata un'alterazione nel metabolismo dei lipidi e glicolipidi cellulari. Tali modificazioni nelle cellule presentanti l'antigene (APC) potrebbero essere strumentali per esercitare un effetto immunomodulante sia sulla risposta innata, attraverso l'interazione con altre cellule quali macrofagi o DC, sia sulla risposta acquisita, interagendo con linfociti T capaci di riconoscere lipidi e glicolipidi attraverso molecole del complesso CD1. L'obiettivo del nostro progetto è lo studio degli effetti immunomodulanti di lipidi e glicolipidi indotti durante l'infezione delle APC con il virus dell'influenza.

Risultati attesi nel triennio

In seguito a infezione delle APC (monociti/macrofagi, DC) con il virus dell'influenza ci aspettiamo di osservare un cambiamento del pattern dei lipidi e dei glicolipidi endogeni. L'analisi dei geni coinvolti nella sintesi e nelle modificazioni dei lipidi e glicolipidi porteranno all'identificazione dei meccanismi che regolano l'induzione dei lipidi e glicolipidi endogeni indotti in seguito all'infezione con il virus influenzale nelle APC. Inoltre, ci aspettiamo che le variazioni del *pattern* dei lipidi e glicolipidi endogeni nelle APC infettate con il virus dell'influenza esercitino degli effetti immunomodulanti sulla risposta innata, in particolare su macrofagi e DC, e acquisita, su una sottopopolazione di linfociti T CD1 ristretti. Tale studio sarà condotto in soggetti precedentemente esposti al virus influenzale.

Trasferibilità dei risultati

La nostra ricerca potrebbe contribuire ad individuare delle molecole di origine endogena di natura lipidica e glicolipidica con effetti immunomodulanti da utilizzare come target in corso di vaccinazione o immunoterapia. La pubblicazione dei risultati su riviste internazionali, l'invio di *abstract* a congressi nazionali e internazionali, sono 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.

Analisi dell'espressione genica globale tramite *microarray* dello sviluppo sessuale del parassita malarico *Plasmodium falciparum*

Il razionale di questa attività è lo studio dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo degli stadi trasmissibili (stadi sessuati, definiti gametociti) del parassita *Plasmodium falciparum*, e della regolazione dell'espressione genica. L'analisi dei profili globali di trascrizione tramite *microarray* di linee cellulari con diversa capacità di produrre gametociti ha permesso di identificare geni espressi preferenzialmente negli stadi precoci del differenziamento sessuale, che sono attualmente in via di caratterizzazione funzionale.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di geni utilizzabili come markers specifici degli stadi responsabili per la trasmissione del parassita. Identificazione dei meccanismi e delle sequenze coinvolte nella regolazione della trascrizione genica.

Trasferibilità dei risultati

Marker molecolari di stadi specifici di sviluppo del parassita, in particolare delle forme precoci dei gametociti. Identificazione di elementi minimi regolativi specifici dei promotori degli stadi sessuati da utilizzarsi per la costruzione di vettori plasmidici. Messa a punto di protocolli per l'analisi dei risultati dei *microarray*.

Analisi dell'efficacia di nuovi adiuvanti per vaccini mucosali in modelli preclinici

Numerosi studi hanno dimostrato che una buona risposta immune è alla base del controllo di diverse patologie. Grande enfasi quindi viene data alla ricerca di immunoterapie e in particolare di nuove strategie vaccinali, per combattere malattie infettive di varia natura e tumori. Evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato il ruolo fondamentale delle risposte umorali e cellulari specifiche nel controllo della crescita tumorale. Le strategie vaccinali più promettenti si basano su sistemi di *prime-boost*, che utilizzano come immunogeni proteine, DNA e vettori virali esprimenti l'antigene di interesse. Per ottenere una buona risposta immune è necessario utilizzare degli adiuvanti vaccinali in grado di potenziare tale risposta. Basandosi sia sulla fattibilità che sulla efficacia, attenzione viene rivolta anche nella scelta delle vie di somministrazione dell'immunogeno. L'immunizzazione mucosale può essere molto efficace nell'indurre anche una risposta sistemica umorale e cellulare (sia CD4 che CD8 mediata) in presenza di un adiuvante adeguato. In questo progetto ci proponiamo di valutare l'efficacia di nuovi adiuvanti mucosali peptidici, già utilizzati in modelli di infezione, in modelli preclinici di tumori. Topi Balb/c e C57Bl/6 saranno immunizzati per via intranasale con l'immunogeno (antigene tumorale) somministrato con o senza l'adiuvante. A tempi stabiliti verranno valutate le risposte umorali e cellulari nei vari distretti mucosali e sistemici mediante analisi di anticorpi specifici, valutazione della produzione di citochine e dell'attività citotossica da parte delle cellule T antigene-specifiche.

Risultati attesi nel triennio

È previsto che l'utilizzo degli adiuvanti mucosali peptidici determini un'amplificazione delle risposte sia umorali che cellulari mediate dai linfociti CD4 e CD8, rispetto a quelle ottenute immunizzando con il solo antigene. Il potenziamento delle risposte immuni specifiche verso gli antigeni tumorali, ottenuto in presenza dell'adiuvante, permetterà di ridurre il numero di immunizzazioni necessario per ottenere la risposta voluta e soprattutto determinerà un incremento dell'efficacia nel controllo della crescita tumorale. Infatti ci aspettiamo che in un modello di *challenge* con cellule tumorali esprimenti l'antigene di interesse, i topi trattati con l'adiuvante mucosale saranno in grado di controllare meglio la crescita tumorale rispetto ai topi immunizzati con l'antigene senza adiuvante.

Trasferibilità dei risultati

Il modello di studio proposto può essere d'aiuto per la valutazione dell'efficacia dei nuovi adiuvanti mucosali nell'ambito di strategie vaccinali utilizzate nelle immunoterapie.

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 di finanziamenti, anche a livello europeo, di brevetti per nuovi adiuvanti e protocolli terapeutici sono punti focali della progettualità.

Analisi morfologica, fenotipica e funzionale del differenziamento di monociti in cellule dendritiche dopo fagocitosi o interazione con microrganismi a crescita intra ed extra cellulare e conseguenze sulla risposta immunitaria adattativa

Monociti-macrofagi e cellule dendritiche (CD) possono internalizzare, processare e presentare antigeni di microrganismi in associazione a molecole MHC, ma in assenza di un secondo stimolo, rappresentato da molecole costimolatorie (come ad es. B7.1, B7.2) e citochine, i linfociti T specifici per gli antigeni presentati non vanno incontro ad un'adeguata espansione ma possono avere funzioni regolatore oppure anergizzarsi o morire per apoptosi. In presenza GM-CSF e IL-4 o IFN γ , i monociti differenziano in CD, che sono le principali APC in grado di innescare una risposta immunitaria specifica primaria. I monociti, però, sono anche cellule in grado di interagire/fagocitare microrganismi. Chiaramente a seconda del tipo di interazione monocita-microrganismo, vengono attivati recettori monocitari diversi e quindi segnali diversi possono essere trasdotti nel monocita dopo l'interazione a seconda delle molecole esposte sul batterio e in dipendenza dell'opsonizzazione. Dal momento che la fagocitosi di batteri da parte di monociti avviene in un microambiente infiammatorio in cui sono presenti numerose citochine, fra cui citochine che possono indurre differenziamento in CD, la fagocitosi può interferire sul differenziamento di monociti in CD. Scopo di questo progetto è la valutazione dell'eventuale interferenza nel differenziamento a CD di monociti dopo fagocitosi di vari batteri che possono interagire con monociti, e che vengono fagocitati con o senza opsonizzazione.

Risultati attesi nel triennio

Verifica dell'eventuale interferenza di batteri nel differenziamento di monociti in cellule dendritiche efficienti come APC professioniste ha una notevole importanza nella comprensione della patogenesi dell'infezione tubercolare.

Determinazione del ruolo della fagocitosi di batteri opsonizzati con antisieri specifici verso componenti di superficie in presenza o meno di complemento nel differenziamento del monocita

Nonostante l'immunità umorale specifica nelle infezioni intracellulari sia considerata non protettiva, i risultati di questa indagine possono assumere una notevole importanza nel comprendere il ruolo delle Ig da un punto di vista differente rispetto al tradizionale ruolo assegnato loro.

Determinazione della capacità presentante l'antigene di monociti fagocitanti batteri dopo stimolo differenziativo mediante analisi della risposta T cellulare. Sono state descritte CD capaci di indurre una risposta Th1 o diTh2 ? ?reg. Questi dati hanno una notevole importanza in quanto potrebbero dare indicazione della effettiva capacità dei microrganismi di modulare una risposta immunitaria specifica attraverso l'interazione con cellule del sistema immunitario naturale, come i monociti, modificandone fenotipicamente e funzionalmente il differenziamento.

Trasferibilità dei risultati

Il modello di studio proposto può essere alla base dell'identificazione di interazioni batteri-cellule del sistema immunitario naturale non precedentemente messe in evidenza e con rilevanza sulla regolazione della risposta adattativa.

L'ottenimento degli obiettivi permetterà l'individuazione di nuovi *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 abstracts a congressi nazionali e internazionali.

Antigeni glucanici e anticorpi anti-glucano: potenzialità applicative nel campo delle micosi

Lo sviluppo di trattamenti a base di anticorpi (Ab) per la lotta alle micosi sistemiche del soggetto immunocompromesso (candidosi, criptococcosi, aspergillosi) è oggi fortemente auspicato dalla comunità medico-scientifica, sia per la diffusione delle resistenze agli antimicotici, sia per la loro tossicità. Tuttavia, è problematico in queste infezioni discernere gli Ab con reale valore protettivo da quelli irrilevanti o addirittura esacerbanti l'infezione, poiché questo varia grandemente a seconda dell'isotipo e della fine specificità. Il nostro gruppo ha dimostrato che Ab (mono o policlonali) diretti contro i b-glucani, composti presenti nella parete cellulare di molti funghi patogeni, riconoscono e inibiscono nella crescita specie diverse (*C.albicans*, *A.fumigatus*) e conferiscono un buon livello di protezione in modelli sperimentali di candidosi e di aspergillosi invasiva. La struttura conservata dei b-glucani in diversi patogeni fungini e il loro ruolo centrale nell'accrescimento cellulare rende gli Ab anti-glucano dei candidati estremamente originali e promettenti per lo sviluppo di trattamenti immunologici ad ampio "spettro" di attività antifungina. A tutt'oggi, inoltre, non esistono *marker* certi di infezione per candidosi e aspergillosi, mentre la diagnosi microbiologica è lenta e spesso incerta. In particolare, per il monitoraggio della b-glucanemia, che è un utile parametro diagnostico, non sono ancora stati validati reagenti specifici e affidabili. Perciò, gli Ab anti-glucano potrebbero risultare di non trascurabile interesse anche per il miglioramento delle tecniche diagnostiche di queste micosi invasive. Intendiamo perciò valutarne, in modelli sperimentali, le potenzialità applicative per la diagnosi, la profilassi e la terapia delle infezioni invasive da *Candida* e da altri patogeni fungini.

Risultati attesi nel triennio

Grazie alle competenze già acquisite dal nostro gruppo di ricerca nella preparazione e caratterizzazione molecolare di glucani a diversa struttura, di glucani coniugati ad alta immunogenicità e di Ab monoclonali murini, sarà possibile produrre e caratterizzare un *panel* di Ab murini policlonali e monoclonali anti-glucano di diverso isotipo e specificità.

Si utilizzeranno modelli murini di candidosi sistemica in topi immunocompetenti o immunocompromessi sottoposti a trattamento preventivo o terapeutico con i diversi Ab, anche in associazione con la terapia antimicotica, per valutare le attività protettive degli Ab ottenuti. Analoghi modelli saranno impiegati per verificare l'occorrenza di *cross*-protezione verso *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. In saggi *in vitro* si valuterà la capacità degli Ab di promuovere le attività anti-fungine di neutrofili o macrofagi e le eventuali attività citotociche o citostatiche. Poiché i b-glucani hanno spiccate attività immunomodulatorie e si accumulano nel circolo e nei tessuti in corso di infezione fungina, sarà anche investigata l'influenza degli Ab anti-glucano sull'espressione delle risposte Th1 antifungine, importanti per la protezione anche quando questa è ultimamente mediata da anticorpi. Ciò permetterà di ottenere informazioni sul meccanismo di azione degli Ab anti-glucano.

Verrà infine investigata la capacità degli Ab di rivelare la presenza di glucano fungino nel siero e in altri campioni biologici, in comparazione con i *kit* diagnostici non specifici (G-test) attualmente impiegati allo scopo, in gruppi di soggetti sani o con infezioni invasive da funghi opportunisti aventi glucano nella loro parete cellulare, per valutarne le possibili applicazioni diagnostiche.

Trasferibilità dei risultati

Dall'insieme di questa sperimentazione, ci si attende di sviluppare nuovi reagenti e di porre le prime basi conoscitive sull'utilizzo di anticorpi anti-glucano quali strumenti diagnostici o terapeutici per il controllo delle candidosi e di altre micosi invasive dell'ospite immunocompromesso. Le informazioni ottenute permetteranno di valutare le potenzialità

applicative degli anticorpi anti-glucano e di razionalizzare future strategie sperimentali miranti allo sviluppo di *kit* diagnostici e di anticorpi monoclonali umani ad attività profilattica e/o terapeutica. I risultati di questi studi verranno trasferiti alla comunità scientifica mediante pubblicazione su riviste internazionali qualificate. I reagenti ottenuti saranno oggetto di brevetto internazionale.

Antigeni parassitari come stimolanti o modulanti della risposta immune intestinale

L'attività di ricerca si svilupperà su due direttrici indipendenti. Nell'ambito del progetto AIDS, i peptidi ricombinanti SA35 e SA40, identificati nel nostro laboratorio, rappresentano porzioni di due diverse proteine secrete dagli sporozoi di *Cryptosporidium parvum* prima dell'invasione della cellula ospite. I suddetti peptidi sono stati parzialmente caratterizzati dimostrandosi *target* della risposta cellulare verso il parassita e elementi fondamentali per il mantenimento della memoria immunologica e dunque possibili candidati per lo sviluppo di strategie di tipo preventivo. L'obiettivo del progetto è la valutazione in un modello murino della protezione verso l'infezione conferita da questi peptidi.

Il secondo aspetto del progetto riguarda le malattie infiammatorie croniche intestinali. Recentemente, la somministrazione di uova di *Trichuris suis*, parassita del maiale, a pazienti adulti affetti da malattia di Crohn ha mostrato un significativo (80%) effetto terapeutico, in assenza di effetti collaterali. I meccanismi di tale effetto non sono definiti e non è al momento nemmeno chiaro se sia essenziale la somministrazione di uova vive o se, al contrario, l'effetto terapeutico possa essere indotto da alcune componenti del parassita (acidi nucleici, componenti strutturali di membrana, ecc.) in grado di interagire direttamente con il sistema immune attraverso l'immunità innata. Obiettivo della presente proposta è di verificare in un modello *in vitro* (frammenti biotici delle zone di mucosa interessata dal processo infiammatorio) la possibilità che l'effetto terapeutico osservato in vivo possa essere determinato da *T. suis* inattivati o da sue componenti.

Risultati attesi nel triennio

Conferimento di protezione all'infezione da *C. parvum* in topi BALB/c immunizzati con i peptidi ricombinanti SA35 e SA40, che potrebbe portare ulteriori elementi conoscitivi allo sviluppo di presidi vaccinali per il trattamento della criptosporidiosi;

Identificazione delle componenti del parassita attive nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali che potrebbe fornire indicazioni utili allo sviluppo di protocolli terapeutici per queste patologie.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale del 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 protezione dei peptidi ricombinanti SA35 e SA40 verso la infezione da *Cryptosporidium spp.*, si provvederà a valutare tale effetto in altri modelli animali.

Per quanto riguarda l'individuazione delle componenti di *T. suis* attive, le conoscenze acquisite potranno essere fornite all'industria per la loro eventuale produzione. Inoltre si provvederà al loro utilizzo in *trial* clinici.

Approcci immunoterapeutici innovativi nella lotta alle infezioni opportunistiche

Ottenimento di anticorpi e peptidi microbici ad ampio spettro d'azione, con preferenziale *target* il glucano o la sua sintesi nella parete cellulare. Utilizzazione del recettore della tossina killer coniugato alla tossina difterica CRM197, come vaccino transfiletico e sorgente di immunizzazione per l'ottenimento di anticorpi fungicidi. Utilizzazione dei geni dell'idiotipo dell'anticorpo neutralizzante la tossina killer per la vaccinazione genica transfiletica.

Risultati attesi nel triennio

Validazione terapeutica di anticorpi anti-betaglucano e peptidi microbici in modelli sperimentali. Utilizzazione di candidati vaccinali (sequenze geniche, glicoconiugati del recettore della tossina *killer*, proteine) per la vaccinazione transfiletica. Nuove informazioni sulla rete idiotipica e la sua efficacia nel controllo delle malattie infettive. Uso di anticorpi microbici come terapia delle infezioni opportunistiche.

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità dei risultati alla Comunità Scientifica Nazionale e Internazionale attraverso pubblicazioni indexate. *Transfer* tecnologico ai laboratori del Servizio Sanitario Nazionale. Formazione tecnologica per meglio adoperare le armi diagnostiche e terapeutiche per la preparazione al bioterrorismo.

Approcci innovativi ad un vaccino antitubercolare a DNA

Un vaccino antitubercolare già esiste (*Bacillus Calmette Guerin*, BCG) ma è poco o nulla protettivo verso la malattia tubercolare. Per questo motivo, e in considerazione della grande diffusione della tubercolosi in tutto il mondo, è urgente la preparazione di un nuovo vaccino più efficace. Lo scopo principale di questo progetto è lo sviluppo di un vaccino antitubercolare combinato a DNA consistente in un plasmide codificante per una proteina altamente immunogenica di MTB e per sequenze relative a prodotti adiuvanti, in una formulazione fisica adatta per la somministrazione parenterale. Tale vaccino verrà saggiato per la risposta immune e la protezione antitubercolare nel topo, in confronto alla protezione indotta dalla vaccinazione con BCG.

Risultati attesi nel triennio

L'uso di un vaccino codificante per un antigene (antigene 85B) e un adiuvante (Tat di HIV) nello stesso plasmide consentirà di dimezzare la quantità di DNA da usare e renderà possibile anche la somministrazione vaccinale in forma di *prime-boosting* (DNA-proteina) usando il plasmide per il *priming* e le proteine 85B e Tat in forma ricombinante per il *boosting*. Lo studio dell'immunogenicità di tali preparazioni potrà essere correlato con l'entità della protezione nel modello di infezione tubercolare nel topo. Ci si aspetta di ottenere un buon candidato vaccinale alla fine della sperimentazione preclinica

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*. Il candidato vaccinale più promettente sarà proposto per la brevettazione a carico dell'ISS

Approcci molecolari nello studio di bartonelle, borrelie, ehrlichie, leptospire e rickettsie e problematiche relative alla diagnosi di *cat scratch disease* (CSD), *Lyme disease*, anaplasmosi, ehrlichiosi umane, leptospirosi e rickettsiosi

Le infezioni causate da Bartonella, Borrelia, Anaplasma, Ehrlichia, Leptospira e Rickettsia occupano un ruolo di primaria importanza nell'ambito delle malattie batteriche, a causa della

gravità dei quadri clinici causati. Data la grande varietà e la frequente aspecificità dei quadri clinici con cui queste malattie si manifestano, la certezza diagnostica può ottenersi soltanto mediante la conferma microbiologica del sospetto clinico. A causa delle caratteristiche biologiche e colturali di *Bartonella*, *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Leptospira* e *Rickettsia*, solo in rari casi è possibile effettuare una indagine microbiologica diversa dalla ricerca anticorpale. Un altro limite è l'incompleta valutazione dei risultati ottenuti mediante PCR. I metodi sierologici maggiormente utilizzati sono: IFA per la ricerca di anticorpi anti *Bartonella*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*; ELISA e WB per il rilevamento di anticorpi anti-*Borrelia*, microagglutinazione-MAT e ELISA per la determinazione di anticorpi anti-*Leptospira*. Il *test* ideale ha una sensibilità e una specificità del 100%. Purtroppo nessuna delle metodiche suddette si avvicina al test ideale. Le cause possono essere ricercate: i) nell'estrema variabilità di alcune specie batteriche e nella loro diversa distribuzione geografica; ii) nelle reazioni crociate che sono alla base dei risultati falsamente-positivi; iii) nell'esistenza di casi falsamente negativi; iv) nella disponibilità in commercio (in alcuni casi) di un grande numero di *kit* diagnostici, diversi per antigene e qualità; v) nella difficoltà (in altri casi) a reperire *kit* commerciali; vi) nella complessità e nell'estrema variabilità della risposta umorale; vii) nella mancanza di standardizzazione dei *kit* commerciali. Comunque, nessuno dei *kit* in commercio per la diagnosi di CSD, *Lyme disease*, anaplasmosi, ehrlichiosi, leptospirosi e rickettsiosi si avvicina al *test* ideale per sensibilità e specificità.

Risultati attesi nel triennio

Isolamento e caratterizzazione di ceppi di *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato*, e *Leptospira interrogans sensu lato* di origine umana e non; studio della risposta anticorpale in soggetti da cui è stato isolato e caratterizzato l'agente infettante.

Individuazione di divergenze e analogie a livello della struttura molecolare di ceppi rappresentativi delle diverse divisioni tassonomiche di *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Leptospira* e *Rickettsia* utili ai fini tassonomici o diagnostici.

Elaborazione, messa a punto e valutazione del protocollo di *Real-Time* PCR basato sull'utilizzo del *Light Cycler* e di sonde fluorescenti FRET per l'identificazione di patogeni speciali in campioni biologici sia di origine umana che non e verifica della capacità a discriminare tra le diverse specie geneticamente correlate.

Determinazione del grado di *cross*-reattività tra ceppi autoctoni di *Bartonella* e quelli utilizzati per la preparazione di *kit* commerciali.

Valutazione delle varie risposte anticorpali in corso di *Lyme disease* mediante i criteri stabiliti dal CDC per gli USA, dall'EUCALB per l'Europa, e quelli indicati dalle Ditte produttrici dei *kit* commerciali. Scopo finale è quello di definire per l'Italia i *pattern* antigenici con cui identificare senza dubbio una risposta positiva per *Lyme disease*.

Valutazione della sensibilità e della specificità dei *kit* commerciali utilizzati nella diagnosi di anaplasmosi, borreliosi, CSD, ehrlichiosi, leptospirosi e rickettsiosi.

Verificare se in Italia circolano altre rickettsie del gruppo delle *Spotte fever* oltre a *Rickettsia conorii*.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di una collezione di ceppi italiani di bartonelle, borrelie e leptospire che possono essere utili alla Comunità scientifica sia a fini scientifici che diagnostici;

Messa a punto di nuove metodologie utili per una rapida identificazione e caratterizzazione di suddetti batteri e di altri patogeni speciali quali anaplasmi, ehrlichie e rickettsie che per motivi diversi sono tutti batteri emergenti o riemergenti.

Valutazione di nuove tecnologie e metodiche che possono essere utilizzate a livello dei Laboratori periferici per una migliore diagnosi di infezioni causate dai suddetti batteri, difficili da isolare.

Disponibilità di dati scientifici sulla circolazione e sulle caratteristiche sia genotipiche che fenotipiche di Bartonella, Borrelia, Anaplasma, Ehrlichia, Leptospira e Rickettsia che possono essere utilizzati sia dalla Comunità scientifica che dalle Ditte produttrici di *kit* diagnostici.

Definizione di criteri per la conferma in Laboratorio di particolari malattie da patogeni speciali quali ad esempio *Lyme disease* e Leptospirosi.

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 problematico.

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 Tecnologia e Salute, l'esigenza di analizzare particolari classi di proteine batteriche di interesse si è concretizzata nello sviluppo di un *software ad hoc* denominato SWIFT descritto su Bioinformatics nel 2005 (D'Avenio G, Grigioni M, Orefici G, Creti R;21:2943-2949).

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 del genoma non ancora annotato di *E. faecium*. 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 a carico di cuore e apparato renale nell'uomo come anche la possibilità di identificare proteine batteriche simili a componenti del cervello umano 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.

Associazione tra artrite reumatoide e aterosclerosi carotidea: ruolo della risposta immunitaria e identificazione di marcatori infiammatori circolanti

L'artrite reumatoide (AR) è una patologia autoimmune sistemica che colpisce la sinovia di varie articolazioni. In corso di AR la sinovia è caratterizzata da un infiltrato infiammatorio composto principalmente da linfociti T e macrofagi che interagiscono strettamente producendo citochine pro-infiammatorie quali TNF- α e IL-1. I linfociti T presenti nella sinovia probabilmente riconoscono antigeni artritogenici e tale riconoscimento antigenico avvia il processo infiammatorio che determina la distruzione dei tessuti articolari. I linfociti T e i fagociti giocano quindi un ruolo fondamentale sia nell'esordio che nella progressione della patologia. Pur essendo noto che si tratta di una patologia autoimmune, non è ancora stato chiarito quali autoantigeni siano responsabili dell'insorgenza dell'AR. Vari studi hanno individuato possibili autoantigeni coinvolti, tra cui il collagene di tipo II e l'enzima glucosio-6-fosfato isomerasi. È stata messa in evidenza una associazione tra AR e aterosclerosi. Pazienti con AR presentano una aumentata mortalità dovuta a patologie cardiovascolari e l'AR sembra essere essa stessa un fattore di rischio per lo sviluppo di aterosclerosi accelerata. Scopo del presente progetto sarà quello di approfondire l'associazione tra AR e aterosclerosi, con particolare attenzione all'individuazione di candidati autoantigeni e di marcatori infiammatori circolanti comuni alle due patologie

Risultati attesi nel triennio

1) Identificazione di marcatori immunologici circolanti associati ad aterosclerosi accelerata in corso di artrite reumatoide; 2) Identificazione di molecole *self* o *self* modificate quali *target* antigenici della risposta autoimmune associata ad artrite reumatoide

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite porterebbero allo sviluppo di nuovi strumenti di intervento preventivo e riparativo che potrebbero interferire con i meccanismi di danno vascolare in pazienti con aterosclerosi accelerata associata ad artrite reumatoide. 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 artrite reumatoide

Associazione tra fattori ambientali nei meccanismi genetici, molecolari e cellulari delle patologie allergiche (Progetto art. 12, DL.vo 502/92)

Sono pertanto da considerarsi di grande interesse gli studi volti a caratterizzare la popolazione in funzione della precisa esposizione ambientale a varie fonti allergeniche, correlando la sintomatologia con la presenza degli allergeni nell'ambiente ove i soggetti prevalentemente vivono, siano essi ambienti *indoor*, *outdoor* o entrambi, in funzione di opportuni marcatori genetici. Sino ad ora, i marcatori genetici prevalentemente investigati sono stati associati con la sintesi delle IgE e delle citochine che caratterizzano la risposta immunitaria sostenuta da linfociti T helper di tipo 2, mentre recentemente sono stati evidenziati nuovi marcatori, quali il CTLA-4, che caratterizzati nella loro funzione quando espressi sui linfociti B,

hanno mostrato importanti proprietà e caratteristiche che ne rendono particolarmente interessante lo studio in popolazioni selezionate e caratterizzate. L'obiettivo finale del presente progetto è la caratterizzazione di varie popolazioni da un punto di vista allergologico mediante somministrazione di questionario e esame clinico specialistico, in funzione della loro esposizione a fonti allergeniche, identificate e quantificate nelle varie situazioni ambientali e in relazione al loro polimorfismo genico di molecole rilevanti nel controllo della sintesi di IgE. Parallelamente, verrà valutato in opportuni modelli animali il ruolo di fattori solubili coinvolti nella genesi e nella modulazione della risposta allergica

Risultati attesi nel triennio

Identificazione nelle varie popolazioni selezionate delle caratteristiche cliniche e di esposizione ambientale a varie fonti allergeniche *outdoor* e *indoor*, con acquisizione di informazioni circa la presenza di nuove componenti allergeniche importanti nei vari ambienti considerati. Associazione nelle popolazioni individuate tra polimorfismo, espressione e funzione del recettore CTLA-4, esposizione allergenica e sintomatologia clinica. Identificazione del ruolo regolatorio esercitato da differenti citochine sulla genesi e sulla modulazione delle malattie allergiche

Trasferibilità dei risultati

Sono stati valutati e monitorati allergeni *indoor* e *outdoor*, e ne è stata valutata la relazione tra la loro presenza e il livello di sensibilizzazione allergica nella popolazione esposta. È stato individuato un campione di popolazione scolastica per lo studio epidemiologico e una popolazione per la valutazione degli effetti dell'ambiente di lavoro. Strumento di grande utilità in questo ambito del progetto è stata l'attività di messa a punto e standardizzazione di metodi analitici per la determinazione degli allergeni indoor (risultato trasferibile). La principale conclusione dello studio ambientale è che non è possibile definire una soglia di concentrazione di allergene in grado di indurre sensibilizzazione, come suggerito anche da studi preliminari basati su prelievi di polvere domestica per valutare il grado di associazione tra concentrazione dell'allergene, sintomatologia e *background* genetico (risultato trasferibile). Un altro importante risultato trasferibile è stato quello di avere dimostrato in modelli animali che è possibile modulare le IgE mediante opportune dosi di antigene.

Attività di *counselling* telefonico sull'infezione da HIV, sull'AIDS e sulle malattie sessualmente trasmesse

Il Telefono Verde AIDS (TVA), Servizio anonimo e gratuito, è impegnato in interventi di prevenzione primaria e secondaria dell'infezione da HIV, dell'AIDS e delle Malattie Sessualmente Trasmesse (MST) rivolti alla popolazione generale, attraverso l'attività di *counselling* telefonico. Tale attività permette di erogare informazioni scientifiche, aggiornate e personalizzate, di favorire attraverso un colloquio specialistico mirato l'individuazione del "reale" problema della persona/utente, di prospettare insieme alla persona/utente possibili soluzioni, di facilitare nella persona/utente la diminuzione dell'ansia per una migliore ricezione del messaggio informativo. Il TVA si avvale di sei linee telefoniche, attive dal lunedì al venerdì, h 13.00 - 18.00, di un archivio, aggiornato periodicamente, costituito da più di 1000 centri diagnostico-clinici e psico-socio-sanitari e di un *software* di data *entry* e di gestione archivi *on line*.

Dal 2003 il Servizio, è coinvolto nelle procedure di arruolamento per la sperimentazione del vaccino anti-HIV basato sulla proteina TAT. Nell'ambito dell'attività di *counselling* telefonico si sono avviate indagini mirate (*survey* telefoniche) che consentono di sondare fattori psicosociali e comportamentali degli utenti del Servizio.

Risultati attesi nel triennio

Erogare un'informazione scientifica sull'infezione da HIV, sull'AIDS e sulle MST, tenendo conto della complessità delle variabili psicologiche, sociali e culturali dei singoli individui

Individuare i bisogni informativi dei cittadini italiani e stranieri sull'infezione da HIV, sull'AIDS e sulle MST al fine di programmare strategie mirate di prevenzione e di educazione alla salute

Trasformare risultati di studi e ricerche sull'infezione da HIV, sull'AIDS e sulle MST in messaggi efficaci, in grado di attivare nelle persone alle quali sono rivolti comportamenti e stili di vita funzionali alla promozione della salute e al miglioramento della qualità di vita.

Trasferibilità dei risultati

L'attività di *counselling* telefonico consente di avere una panoramica dei bisogni informativi della popolazione generale e di target specifici sull'infezione da HIV/AIDS/MST.

La conoscenza dei bisogni informativi in merito a tali patologie rappresenta un elemento indispensabile nella programmazione di interventi di prevenzione e di educazione sanitaria più efficaci, nonché nella creazione di campagne informativo-educative del Ministero della Salute.

Azione Concertata Italiana per lo sviluppo di un vaccino contro HIV/AIDS (ICAV)

La parte di progetto afferente alla presente attività si prefigge la disseminazione di fondamentali concetti regolatori di base, legati alla esistenza di Linee Guide e dispositivi di legge che regolano la sperimentazione preclinica e clinica di un qualsiasi farmaco, inclusi i vaccini ottenuti mediante tecnologia del DNA ricombinante. In particolare questa parte del progetto si propone di effettuare formazione di possibili ricercatori interessati allo sviluppo applicativo delle loro innovazioni e scoperte. Tra i vari aspetti, la formazione prevee una puntuale descrizione delle *Good Laboratory Practice*, delle *Good Manufacturing Practice* e delle *Good Clinical Practice*, con indicazione di quali aspetti sono maggiormente applicabili allo sviluppo produzione e sperimentazione di un vaccino ricombinante.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo principale del progetto è la formazione e la disseminazione dell'informazione ai potenziali interessati, quali i ricercatori, affinché siano a conoscenza delle nuove normative e disposizioni e non svolgano attività ritenute di ricerca scientifica in palese contrasto con le leggi e gli obblighi esistenti, sia nazionali che europei.

Trasferibilità dei risultati

Tutti i soggetti che svolgono ricerca e che potenzialmente hanno ottenuto prodotti che intendono avviare alla sperimentazione preclinica e clinica sono bersaglio per le attività di questo progetto.

Biology and Pathology of Malaria Parasite - BioMalPar (Network of Excellence FP6)

Questa rete di eccellenza si propone di promuovere ricerca di base ad alto livello e integrazione tra diverse Istituzioni europee impegnate nella ricerca in malaria e che utilizzino gli approcci metodologici della genomica funzionale. Le attività in collaborazione includono anche l'istituzione di una scuola di dottorato europea. L'ISS è coinvolto nelle seguenti linee di ricerca: identificazione e caratterizzazione, tramite spettrometria di massa, di comparti di membrana del parassita coinvolti nel *trafficking* cellulare e nella trasduzione del segnale in collaborazione con C. Braun Breton Università di Montpellier, M. Lanzer Università di Heidelberg; dinamica della cromatina in collaborazione con H. Sunnemberg, NCMLS *Molecular Biology* Nijmegen; regolazione dell'espressione genica durante il ciclo eritrocitario e nell'ospite vettore la zanzara

Anopheles in collaborazione con C.J. Janse e A.P. Waters Università di Leida, Inga Siden Kiamos *Institute of Molecular Biology and Biotechnology*.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di molecole e modificazioni post-traduzionali coinvolte nella trasduzione del segnale. Meccanismi molecolari alla base della regolazione genica in Plasmodio. Identificazione delle interazioni tra proteine coinvolte nella dinamica della cromatina.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di *marker* molecolari di stadi e comparti specifici del parassita. Generazione di linee transgeniche che esprimano proteine tracciabili *in vivo* tramite fusione con *reporter* fluorescenti. Organizzazione di un database di proteine localizzate in comparti cellulari coinvolti nel *trafficking* e nel *signaling*.

BIOMALPAR Biology and Pathology of the Malaria Parasite Partner 29

Applicazione di approcci post-genomici (*proteomics*, trasfezione del parassita) a studi dei meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo di *Plasmodium falciparum*, e in particolare del commitment al differenziamento sessuale e della esecuzione del programma regolativo che presiede alla formazione degli stadi trasmissibili del parassita.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione di proteine e marcatori molecolari specifici degli stadi trasmissibili del parassita. Caratterizzazione cellulare e molecolare degli stadi precoci di differenziamento dei gametociti di *P. falciparum*.

Trasferibilità dei risultati

Sviluppo di marcatori molecolari per stadi specifici di sviluppo del parassita. Produzione di linee di *P. falciparum* che esprimono marcatori fluorescenti stadio specifici per uso in *screening* di composti bio-attivi.

Caratteri di virulenza di *Legionella pneumophila*

La patogenesi di *Legionella* è dovuta alla sua capacità di invadere e poi moltiplicarsi all'interno dei macrofagi alveolari, riuscendo a evadere il sistema di fusione fagosoma-lisosoma, che normalmente è attivato dai macrofagi.

Negli ultimi dieci anni, un notevole progresso si è avuto nell'individuazione dei fattori batterici responsabili dell'infezione intracellulare e nella determinazione di fattori di virulenza. È stato visto, ad esempio, che alcune strutture di superficie come il flagello e i pili, aumentano la capacità di infezione. Le più avanzate tecniche di biologia molecolare, hanno portato alla scoperta di alcuni dei geni associati alla virulenza, quali *mip* e i geni *dot/icm*, localizzati nei loci che codificano per il sistema di secrezione di tipo IV. Ci sono poi altri geni per i quali è stato visto un certo coinvolgimento nella patogenicità di *Legionella* ma, in realtà, molto rimane ancora da investigare.

Nel nostro laboratorio, è stato individuato un mutante spontaneo avirulento di *Legionella pneumophila* sierogruppo 6. L'analisi del proteoma si rivela un ottimo approccio sperimentale per la determinazione e caratterizzazione di tutto ciò che è espresso e, quindi, prodotto all'interno della cellula. Nel caso del nostro mutante, dove prevediamo che siano accadute delle clamorose alterazioni, sarà sicuramente vantaggioso un approccio di questo tipo. Il confronto di mappe proteiche consentirà, in tempi relativamente rapidi, di individuare eventuali differenze nel *pattern* proteico, che rispecchierà variazioni nell'espressione genica. La successiva determinazione dell'identità delle proteine, differentemente espresse o assenti in uno dei due ceppi, potrà far luce su possibili nuovi determinanti di virulenza.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione attraverso studi comparativi delle mappe proteiche dei due ceppi, *wild type* e il mutante, di nuovi determinanti della virulenza.

Analisi del proteoma allo scopo di creare un “database di mappe proteomiche” per l’identificazione delle Legonella

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti da questo studio contribuiranno alla conoscenza dei fattori di virulenza di *Legionella pneumophila* e saranno oggetto di pubblicazioni internazionali.

I dati parziali dell’applicazione di tali metodologie sono stati oggetto di abstracts presentati a due congressi internazionali

Caratteristiche biochimiche, patogenetiche e immunologiche di agenti batterici di bioterrorismo

Messa a punto di metodiche di isolamento, coltivazione e identificazione dei patogeni batterici con elevata probabilità di uso per attacchi bioterroristici, in particolare *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis*. Creazione di una collezione di ceppi batterici caratterizzati dal punto di vista molecolare e di un *database* di biotipi. Messa a punto di metodiche molecolari per la diagnosi rapida. La tecnologia della *Real-Time* PCR già disponibile in laboratorio, sarà essere sviluppata sia per potenziare le capacità diagnostiche sia per la conferma e tipizzazione dei ceppi isolati, nonché per la loro determinazione quantitativa. Studiare la fattibilità dell’identificazione di nuovi componenti antigenici di *B. anthracis* da proporre come candidati vaccinali nonché di anticorpi anti-*tossiner* per uso immunoterapeutico.

Risultati attesi nel triennio

Creazione di una ceppoteca comprendente agenti di buioterrorismo perfettamente tipizzati con tecniche molecolari e caratterizzati per il pattern di antibiotico-sensibilità. Validazione e standardizzazione di metodiche rapide di diagnosi e conferma, in particolare con l’uso della *Real-time* PCR quantitativa e con le tecniche di buotipizzazione molecolare (ad es. MLVA per *B.anthraxis*). Individuazione di antigeni di *B. anthracis* da studiare e proporre come potenziali candidati vaccinali per l’uomo e ottenimento di anticorpi terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità dei risultati alla Comunità Scientifica Nazionale e Internazionale attraverso pubblicazioni indexate. *Transfer* tecnologico ai laboratori del Servizio Sanitario Nazionale. Formazione tecnologica per meglio adoperare le armi diagnostiche e terapeutiche per la preparazione al bioterrorismo

Caratteristiche fenotipiche e genotipiche di ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* isolati in pazienti HIV positivi e negativi e loro associazioni con fattori comportamentali e geografici

Nell’ambito del Progetto “Sorveglianza delle Meningiti Batteriche” finanziato dal Ministero della Salute si è resa necessaria la messa a punto di metodologie molecolari per la diagnosi, la tipizzazione e il saggio di sensibilità agli antibiotici di *Neisseria meningitidis* con particolare riferimento a campioni clinici coltura negativi. Il numero di casi di meningite batterica ad eziologia sconosciuta è, infatti, aumentato negli ultimi anni dovuto soprattutto a un più repentino uso di antibiotici all’inizio della sintomatologia clinica. Per una adeguata sorveglianza si rende quindi necessario avere a disposizione tecniche per una rapida diagnosi e tipizzazione molecolare dell’agente eziologico. È anche auspicabile la possibilità di avere a disposizione metodi per l’individuazione di resistenze agli antibiotici normalmente in uso per la terapia e la

profilassi della meningite meningococcica anche in quei casi in cui l'isolamento batterico sia risultato negativo. Per questo, obiettivo principale di questo studio è quello di individuare e utilizzare *target* nuovi per l'identificazione, tipizzazione molecolare e predittivi di resistenza a uno o più antibiotici direttamente in campioni di *liquor e/o* sangue. Questi *target* verranno utilizzati in PCR *realtime*, *MultiLocus Sequence Typing* e *PorA VR typing* per una completa caratterizzazione dei campioni coltura negativi. La diagnostica sierologica attraverso l'uso di ELISA su coppie di sieri acuto e convalescente permetterà anche di valutare la capacità battericida di sieri collezionati da pazienti con infezione da ceppi di *N. meningitidis* appartenenti a diversi fenotipi e genotipi.

Risultati attesi nel triennio

Da questa ricerca si intende individuare nuovi marcatori genici sufficientemente conservati nella popolazione batterica da poter essere utilizzati per una rapida diagnosi e tipizzazione molecolare di *N. meningitidis* direttamente in campioni clinici coltura negativi. L'utilizzo di approcci molecolari rapidi come la PCR *realtime* potranno sicuramente migliorare la capacità diagnostica nell'ambito delle meningiti meningococciche. La tipizzazione molecolare direttamente da campione clinico fornisce anche l'opportunità di classificare e confrontare a livello internazionale tutti i casi coltura negativi. Per gli studi che verranno realizzati su coppie di sieri, acuto e convalescente, si intende mettere a punto saggi ELISA per la valutazione della capacità battericida di questi sieri in fasi diverse della malattia. Verranno anche valutate le attività *cross* reattive di sieri collezionati da malati infetti con ceppi di *N.meningitidis* appartenenti a specifici fenotipi e genotipi.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti da questo studio permetteranno, in primo luogo, di migliorare la sorveglianza a livello nazionale dei casi di meningite meningococcica anche nei casi coltura negativi o di confermare quelli ad eziologia incerta. Permetterà anche di fornire protocolli molecolari utilizzabili dai presidi periferici per una corretta diagnosi dei casi. La possibilità di individuare, attraverso tecniche molecolari direttamente sul campione clinico, resistenze a uno o più antibiotici fornirà un utile strumento per un miglior trattamento farmacologico sia per la terapia che per la profilassi dei casi di meningite meningococcica.

Caratterizzazione biologica e meccanismi di interazione virus-cellula del Coronavirus associato alla SARS

Lo studio della sequenza dell'agente eziologico della SARS suggerisce che questo nuovo *Coronavirus* sia più simile ad altri virus animali (bovini e murini), appartenenti alla stessa famiglia, che ad altri coronavirus umani (229E e OC43), che sono estremamente diffusi, interessano le vie respiratorie alte, e provocano nell'uomo banali raffreddori. Sono stati per questo ipotizzati vari serbatoi animali. Dati recenti mostrano che il virus è presente non solo nelle alte vie respiratorie, ma anche nell'intestino e che viene escreto con le feci anche dopo l'avvenuta guarigione. È quindi ipotizzabile che il virus si replichi in differenti tipi cellulari e in differenti organi. Evidenze sperimentali indicano che gran parte del danno cellulare causato dai membri della famiglia *Coronavirus* è riconducibile all'attivazione di meccanismi apoptotici, ed è quindi possibile che questo fenomeno si verifichi anche durante l'infezione dovuta al SARS-coronavirus.

Lo scopo di questo progetto è di studiare la capacità di replicazione del SARS-coronavirus in vari tipi cellulari di origine umana e animale, al fine di valutare lo spettro d'organo e d'ospite e le proteine coinvolte nell'infezione virale, e di analizzare i meccanismi molecolari di citotossicità attivati in linee cellulari infettate.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione del tropismo virale d'organo individuazione di ospiti potenzialmente suscettibili.

Identificazione di marcatori tipici di citotossicità

Caratterizzazione dell'apoptosi quale meccanismo di citopatogenesi del SARS-coronavirus.

Trasferibilità dei risultati

Sorveglianza di possibili animali serbatoio

Caratterizzazione dell'attività immunomodulante e transattivatoria di adiuvanti endogeni indotti in cellule presentanti l'antigene dopo infezione o stimolazione con agonisti dei recettori Toll

Il riconoscimento dell'ampia gamma di molecole di origine microbica, definite PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), in cellule presentanti l'antigene (APC), quali cellule dendritiche (DC) mieloidi e plasmacitoidi e macrofagi, avviene principalmente attraverso i recettori Toll (TLR). La stimolazione delle APC attraverso l'interazione di diversi patogeni o dei loro derivati con i TLR determina la loro attivazione e/o maturazione che correla con modificazioni morfo-funzionali importanti per la stimolazione dei linfociti. Un aspetto fondamentale della risposta delle APC alle infezioni, approfondito nel corso dei nostri studi, riguarda l'espressione degli IFN in DC stimulate con agonisti dei recettori Toll o infettate da agenti batterici. I risultati ottenuti da questi studi indicano che nelle DC esiste una trascrizione selettiva dei vari tipi di IFN (Remoli et al, J Immunol. 2002; Coccia et, Eur J Immunol. 2004) suggerendo un loro diretto coinvolgimento nel processo maturativo di queste cellule oltre che sulla proliferazione, differenziamento e maturazione di diverse popolazioni leucocitarie. Il nostro interesse è principalmente rivolto allo studio della regolazione dell'espressione di queste citochine e all'analisi dei loro effetti nelle DC in quanto queste cellule, grazie alla loro capacità di catturare gli antigeni nei tessuti infiammati, di migrare (dal sangue ai tessuti, e da questi agli organi linfoidi) e di funzionare come le più potenti cellule presentanti l'antigene, rappresentano delle cellule fondamentali per la regolazione della risposta immunitaria indotta da patogeni o durante malattie infiammatorie croniche. Inoltre, la recente identificazione della sottopopolazione di DC plasmacitoidi ha ulteriormente avvalorato il binomio IFN di tipo I e DC. Le DC plasmacitoidi rappresentano infatti la principale fonte di IFN-alfa/beta in alcuni processi infiammatori.

Risultati attesi nel triennio

In questo progetto intendiamo sviluppare alcune nostre recenti osservazioni relative all'espressione dei geni degli IFN di tipo I durante la maturazione delle DC stimulate con agonisti dei TLR e da infezione batteriche (*Mycobacterium tuberculosis*) e virali (virus Sendai e influenza).

Sulla base di queste osservazioni i risultati di questo studio consentiranno di analizzare se altri patogeni (BCG, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Bordetella pertussis*) sono in grado di indurre i geni degli IFN di tipo I e eventualmente caratterizzare i signaling intracellulari coinvolti in tale induzione).

Una volta identificata la capacità di un patogeno di indurre gli IFN di tipo I si verificherà, attraverso esperimenti di *microarray*, il trascrittoma associato a tale produzione e valutare se l'espressione dei geni indotti dall'IFN possa influenzare la capacità immunostimolatoria delle DC stesse.

Infatti uno degli aspetti più importanti di questo progetto prevede lo studio del ruolo svolto dalla produzione dell'IFN sulle capacità stimolatorie delle DC stesse. Esperimenti *in vitro* hanno evidenziato la capacità dell'IFN- β di attivare le DC in modo da reagire più prontamente e

in maniera più intensa ad una successiva interazione con il patogeno o con un opportuno stimolo maturativo.

Verrà anche valutato il potere immunomodulatorio dell'IFN di tipo I nell'ambito degli studi mirati a potenziare la risposta Th1 verso patogeni che non possiedono tali capacità, quali *Aspergillus fumigatus* o BCG.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione degli stimoli attivatori e dei patogeni in grado di indurre la trascrizione dei geni degli IFN, la definizione del ruolo svolto da queste citochine nella regolazione della trascrizione genica associata alla risposta innata e nella maturazione delle DC, la valutazione del potenziale immunoadiuvante di queste citochine nei confronti della risposta Th1 forniranno informazioni di potenziale rilevanza per la definizione di nuovi strumenti di lotta contro infezioni di rilievo nella sanità pubblica. In particolare l'identificazione di molecole importanti per l'induzione degli IFN consentiranno la definizione di strategie non convenzionali mirate a contrastare i fenomeni di immunoevasione microbica e allo stesso tempo di potenziare la risposta Th1 verso patogeni che non possiedono tali capacità, quali *Aspergillus fumigatus* o BCG.

Caratterizzazione e valutazione quantitativa di componenti allergeniche del lattice in ambienti professionali

Nell'ultimo decennio, l'allergia al lattice della gomma naturale (*latex*) è stata riconosciuta come un problema occupazionale soprattutto tra gli operatori sanitari e altre categorie che per motivi professionali fanno largo uso di guanti protettivi in *latex*, in primo luogo i parrucchieri. I sintomi clinici della allergia al *latex* sono causati generalmente dal contatto diretto con il prodotto contenente *latex*, ma possono anche risultare dall'inalazione di allergeni aerodispersi rilasciati dal *latex* e veicolati da sostanze quali la polvere che cosparge internamente i guanti. Studi sull'asma occupazionale, corredati in alcuni casi da *test* di provocazione inalatoria suggeriscono che l'uso esteso di guanti in *latex* cosparsi di polvere e la dispersione nell'ambiente degli allergeni dal *latex* deve essere considerato un significativo problema di salute nei soggetti professionalmente esposti. In tempi recenti, le singole componenti allergeniche del lattice sono state purificate e clonate; la disponibilità di tali molecole in forma ricombinante ha consentito di associare la reattività IgE dei soggetti di diverse categorie professionali ad alcuni specifici allergeni.

La U.O. si propone quindi di valutare sia su campioni ambientali (polvere, aria) prelevati negli ambienti professionali in studio (negozi di parrucchiere), sia su campioni di guanti in lattice, il contenuto di allergeni provenienti dal lattice della gomma. I metodi usati includeranno *kit* commerciali per la valutazione specifica di particolari componenti allergeniche, precedentemente validati in confronto a metodiche *in-house* basate sul riconoscimento di IgE umane. Verranno condotte in parallelo analisi sierologiche sulla risposta IgE dei soggetti esposti agli allergeni monitorati come sopra descritto.

Risultati attesi nel triennio

Selezione di materiali (guanti) a basso contenuto allergenico. Correlazioni tra dati sulla presenza ambientale di allergeni del lattice in ambienti professionali e dati personali sui lavoratori esposti.

Trasferibilità dei risultati

Miglioramento della qualità e sicurezza d'uso di materiali utilizzati in ambienti professionali. Informazione del personale esposto professionalmente.

Caratterizzazione virale e patogenetica delle infezioni da virus epatitici

La presente scheda include il proseguimento dell'attività di ricerca svolta da gruppi interni al Reparto "Infezioni da Virus Epatitici" anche in collaborazione con altri Laboratori dell'Istituto e con Centri Clinici specializzati. Le linee di ricerca sono focalizzate all'obiettivo generale dello studio della struttura molecolare, della replicazione virale e della patogenesi dei virus HAV, HBV, HCV e di nuovi virus dell'epatite e varianti virali.

Sono di seguito riportati i titoli dei relativi sottoprogetti:

Sottoprogetto 1. Studio dei fattori virali e di ospite nella patogenesi delle infezioni croniche da virus dell'epatite B e C. Applicazione di modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*.

Sottoprogetto 2. Studio delle caratteristiche strutturali e biologiche di nuovi virus e varianti virali nelle infezioni da virus epatitici. Caratterizzazione eziologica e diagnostica.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi proseguiranno con l'applicazione di modelli sperimentali e con indagini pilota su pazienti con epatite acuta e cronica secondo i seguenti obiettivi:

Per il sottoprogetto 1:

Modificazioni molecolari e di espressione genica nell'epatocarcinogenesi da HBV e HCV;

Caratterizzazione di differenti *pattern* di replicazione del virus dell'epatite B nel modello sperimentale WHV/*Marmota monax* e nella superinfezione e coinfezione di HDV e nell'applicazione di vaccini;

Studio di meccanismi molecolari di citotossicità mediata dalla proteina *dell'envelope* di HCV;

Studio dell'interazione delle proteine strutturali di HCV con le vie di trasduzioni del segnale apoptotico intracellulare.

Per il sottoprogetto 2:

Studio dell'evoluzione genomica del virus dell'epatite e delle possibili associazioni con differenti *pattern* di infezione e trasmissione;

Caratterizzazione genotipica, classificazione e analisi filogenetica di nuovi virus associati ad epatite non-A, non-B, non-C nell'uomo;

Analisi filogenetica di isolati di HEV.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati è relativa all'identificazione di nuovi strumenti metodologici utilizzabili a scopo diagnostico e prognostico.

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 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. Protegge dall'apoptosi i linfociti B e è coinvolto, attraverso il legame con il suo contro-recettore CD31, in processi di migrazione. Tra i molti processi patologici nei quali il CD38 è coinvolto, di rilevanza per questo proposta di ricerca è il suo ruolo nei processi dell'autoimmunità. Autoanticorpi anti-CD38 sono stati identificati in malattie autoimmuni quali il diabete di tipo I e II e la malattia di Graves. Nel diabete, tali anticorpi sono dotati di attività agonista e inducono nelle cellule b del pancreas, esprimenti il CD38, il blocco della secrezione dell'insulina. La presenza di autoanticorpi anti-

CD38 è anche associata a una eccessiva produzione di citochine pro-infiammatorie che possono esacerbare i fenomeni di autoimmunità.

Risultati attesi nel triennio

Recentemente abbiamo dimostrato che il CD38 è un nuovo marcatore delle cellule dendritiche (DC) mature di derivazione monocitaria (Fedele et al, EJI 2004). Dato il ruolo centrale rivestito dalle DC, che rappresentano un ponte tra l'immunità naturale e acquisita, si intende caratterizzare il ruolo del CD38 attraverso l'ottenimento dei seguenti risultati:

verificare se sia un marcatore di maturazione di altri tipi di DC circolanti come le DC plasmacitoidi (pDC);

valutare se sia in grado di coadiuvare processi mediati da altri recettori espressi sulle DC e implicati nell'attivazione e/o nella migrazione di queste cellule, poiché il CD38, nei diversi tipi cellulari finora studiati, è sempre stato trovato associato ad un recettore funzionale cruciale;

caratterizzare il coinvolgimento nell'induzione di citochine e nel processo di polarizzazione della risposta immunitaria, al fine di verificare eventuali disregolazioni del *network* citochinico in patologie infettive e/o autoimmuni;

identificare il ruolo nella regolazione della risposta immunitaria mediata dalle DC, con particolare riguardo all'attivazione di linfociti T citotossici CD8+ e ai meccanismi che determinano la perturbazione della tolleranza al self (induzione di linfociti T regolatori e risposta Th-1 alterata);

e nella protezione e/o induzione di apoptosi quale importante meccanismo di immunoregolazione.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà una comprensione più approfondita del ruolo del CD38 nel sistema immunitario e in particolare nelle funzioni delle DC mieloidi e, possibilmente, nelle pDC. Ciò permetterà di chiarire maggiormente il ruolo di questa molecola in alcune malattie autoimmuni. Tale ruolo potrebbe essere più importante di quello finora considerato, tenuto conto del fatto che tale molecola è espressa sulle DC mature che sono le uniche cellule presentanti l'antigene (APC) in grado di attivare risposte immuni primarie. Lo scopo finale è quello di approntare, ove possibile, strategie di controllo di tali fenomeni patologici.

La pubblicazione dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstracts 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.

Le persone esterne sono: Università di Torino: Fabio Malavasi, Sivia Deaglio, Ada Funaro.

Cellule dendritiche plasmacitoidi nella sclerosi multipla: valutazione del loro ruolo patogenetico e modulazione della loro funzione durante il trattamento con IFN-beta

Recentemente diversi gruppi hanno osservato che alti e persistenti livelli di IFN di tipo I sono responsabili della cronicizzazione dell'infiammazione in diverse malattie autoimmuni (*Lupus* eritematoso, psoriasi, artrite reumatoide, diabete mellito insulino dipendente). Un'altra osservazione interessante riguarda la capacità delle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC) di rilasciare elevate quantità di IFN di tipo I, se opportunamente stimulate, e il loro reclutamento nei tessuti infiammati (*Lupus* 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. Sebbene alcuni gruppi abbiano messo in evidenza la presenza di pDC nel liquido

cerebrospinale di pazienti affetti da diversi tipi di patologie neuroinfiammatorie (sclerosi multipla, neurite ottica), non esistono ad oggi dati riguardanti la capacità di questa sottopopolazione di DC di infiltrare il parenchima cerebrale e sul loro effettivo coinvolgimento nella sclerosi multipla. La sclerosi multipla è la più diffusa patologia infiammatoria cronica e demielinizzante del sistema nervoso centrale, la cui terapia si basa principalmente sull'utilizzo di IFN-beta.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste osservazioni i nostri studi hanno come obiettivi principali l'identificazione del ruolo delle pDC nella sclerosi multipla e lo studio dell'apparente paradosso che consiste nell'utilizzo nella sclerosi multipla di una terapia con IFN di tipo I a cui è stata riconosciuta la capacità di stimolare la polarizzazione dei linfociti Th1, generalmente associata all'induzione di malattie autoimmuni.

Tali obiettivi verranno perseguiti attraverso:

- l'analisi della frequenza e del fenotipo delle pDC circolanti nel donatore sano e nel paziente MS;
- la valutazione della capacità delle pDC circolanti, nel sano e nel paziente, di rilasciare IFN di tipo I in seguito a stimolazione in vitro;
- la caratterizzazione della presenza, distribuzione e stadio maturativi delle pDC nelle sezioni di cervello ottenute da pazienti MS;
- lo studio degli effetti della terapia con IFN-beta sulle proprietà funzionali delle pDC circolanti.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà di individuare se e come questo le pDC sono coinvolte nella patogenesi della sclerosi multipla. Inoltre siccome la somministrazione di IFN-beta sembrerebbe essere associata ad un rallentamento della progressione della malattia e ad una attenuazione della sintomatologia piuttosto che ad una risoluzione vera e propria, risulta importante chiarire i meccanismi responsabili di tali limitati effetti al fine di ottimizzare l'immunoterapia basata sulla somministrazione di IFN-beta per il trattamento SM.

Pertanto lo studio del ruolo svolto dalle pDC e dall'IFN di tipo I nei meccanismi che sottendono i processi infiammatori cronici sono importanti sia per l'identificazione di nuovi *target* terapeutici sia per ottimizzare l'efficacia della terapia con IFN-beta.

Cellule dendritiche plasmacitoidi nella sclerosi multipla: valutazione del loro ruolo patogenetico e modulazione della loro funzione durante il trattamento con IFN-beta

Cellule dendritiche umane e *Aspergillus fumigatus*: studio della loro interazione e impatto sulla risposta immunitaria

Questo progetto intende analizzare le prime fasi dell'interazione dell'*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) con l'ospite nel tentativo di comprendere in che modo questo organismo opportunistico, presente nell'ambiente, diventa patogeno provocando sindromi polmonari nei soggetti immunocompromessi, tra cui l'aspergillosi invasiva. È stato dimostrato che sebbene l'immunità innata attraverso l'azione dei macrofagi e neutrofili svolga un ruolo fondamentale nel contrastare le prime fasi dell'infezione, l'induzione di una risposta Th1 sembra essere un correlato di protezione verso questo patogeno.

Sulla base di queste osservazioni il nostro interesse si è rivolto alle cellule dendritiche (DC) in quanto queste cellule costituiscono un ponte tra l'immunità innata e quella adattativa. I nostri risultati hanno dimostrato che le DC umane, dopo aver internalizzato i conidi, sono capaci di influenzare la risposta innata anti-*aspergillus* attraverso il rilascio selettivo di citochine e chemochine.

Parallelamente abbiamo dimostrato che le DC infettate da *A. fumigatus* acquisiscono un fenotipo maturo inducendo l'espressione sia delle molecole necessarie per la presentazione dell'Ag che per la migrazione verso i linfonodi. Inoltre l'analisi delle citochine regolatrici ha evidenziato che attraverso l'espressione selettiva dei diversi membri della famiglia dell'IL-12, le DC infettate da *A. fumigatus* sono capaci di promuovere una debole risposta Th1 (Gafa et al, Infect Immun 2006).

Risultati attesi nel triennio

L'insieme di queste osservazioni suggerisce che le DC svolgono un ruolo di fondamentale importanza nella regolazione della risposta immunitaria contro l'*A. fumigatus*.

Pertanto i risultati di questi studi consentiranno di approfondire alcuni aspetti:

- dell'induzione dell'attività fungicida (meccanismi ossidativi e *killing*) dei macrofagi e neutrofili da parte di molecole e citochine rilasciate dalle DC infettate;
- della risposta T indotta dalle DC infettate da *A. fumigatus*.

Un altro aspetto che verrà affrontato prevee lo studio dell'interazione della DC con le diverse forme dell'*A. fumigatus* (conidia, *swollen*-conidia, ife), con componenti strutturali o con molecole rilasciate dall'*A. fumigatus*. Questi risultati consentiranno di:

- identificare quali sono le strutture di questo patogeno coinvolte nell'induzione di fattori solubili (citochine e chemochine) o dei meccanismi di difesa;
- identificare i *pathway* molecolari indotti dall'*A. fumigatus* o dai suoi costituenti che regolano la trascrizione delle suddetti fattori.

Questo studio sarà integrato dall'analisi delle modificazioni del trascrittoma dell'*A. fumigatus* in funzione dello stato di maturazione e attivazione delle DC.

Questo progetto è in collaborazione con l'unità *Aspergillus* dell'Istituto Pasteur.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti consentiranno di approfondire la conoscenza dei meccanismi di difesa contro *A. fumigatus* e di valutarne la loro efficacia protettiva. L'ottenimento di questi risultati può essere rilevante al fine di potenziare, attraverso l'uso di adiuvanti, i meccanismi protettivi alterati nei pazienti immunosoppressi o per la messa a punto di terapie innovative basate sull'utilizzo delle cellule dendritiche.

Inoltre l'analisi delle modificazioni del trascrittoma dell'*A. fumigatus* da parte del *milieu* cellulare consentiranno di identificare possibili fattori di virulenza che possono determinare l'evoluzione dell'aspergillosi invasiva.

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 di finanziamenti, anche a livello europeo, è un punto focale della progettualità.

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 6 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 3 Unità Operative italiane, coordinate dall'IZS di Teramo), con il *team* di entomologia medica che fa capo al Dr. R. Romi (responsabile scientifico), del 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 10 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

Consulenza scientifica per la costituzione di una banca dati delle sostanze chimiche presenti nei processi produttivi e nel prodotto finale del comparto tessile

Il progetto nasce nell'ambito dell'associazione Tessile e Salute, creata in prima istanza da un gruppo di Aziende del settore tessile di Biella, unitamente ad alcune strutture del CNR e con l'ausilio di fondi dell'ISPEL e si propone di creare una banca dati che identifichi in prima istanza tutte le sostanze utilizzate nei processi di produzione di prodotti dell'area tessile. Questa necessità nasce originariamente dall'area produttiva del settore tessile di Biella, che ha ravvisato la necessità di identificare in prima istanza se tra le varie sostanze utilizzate nella produzione tessile in Europa fossero presenti sostanze tossiche, cancerogene o in grado di indurre sensibilizzazione cutanea o altre forme di patologia da allergia alle suddette sostanze chimiche. Il progetto è svolto in collaborazione con altre strutture dell'Istituto Superiore di Sanità (Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria). Una volta creata, la Banca Dati, consultabile anche in linea, consentirà, mediante un regolare aggiornamento attraverso i dati di sensibilizzazione a carico di nuove sostanze ottenuti dalla letteratura o recepiti dal pannello delle associazioni scientifiche del settore (dermatologi, allergologi, ecc.) di venire a conoscenza con regolarità di eventuali nuove sostanze con potenzialità sensibilizzanti.

Risultati attesi nel triennio

Il Progetto produrrà una Banca Dati di sostanze potenzialmente sensibilizzanti aggiornabile in maniera regolare in base ai dati di letteratura e alle informazioni fornite dalle Associazioni scientifiche di settore. La banca dati conterrà informazioni riferite alla molecole elencate, quale il numero CAS, i codici di rischio e altro, e indicherà la fonte della informazione. Questo progetto è strettamente integrato con un identico progetto svolto nello stesso ambito in Istituto che si propone un identico obiettivo indicizzando le sostanze per le loro proprietà tossiche, cancerogene, irritanti, teratogene. Tale secondo aspetto si completa con la parte sulle sensibilizzazioni descritta nel presente progetto.

Trasferibilità dei risultati

La Banca dati nel suo insieme sarà consultabile da tutte le aziende, associazioni di consumatori, associazioni scientifiche, ecc. al fine di acquisire informazioni relativamente alle sostanze che, con il progredire delle conoscenze e dell'utilizzo, vanno mostrando rischi sempre maggiori di possedere proprietà sensibilizzanti precedentemente non note.

Controllo di infezioni emergenti e riemergenti in paesi a basso o medio reddito, mediante programmi di cooperazione sanitaria e scambio scientifico e tecnologico

Introduzione - La presente ricerca si inserisce nell'ambito di progetti di cooperazione e scambio scientifico con diversi paesi a basso e medio reddito.

Obiettivo - Realizzare progetti di cooperazione nel campo della ricerca e intervento in malattie infettive emergenti e riemergenti, per offrire un contributo a uno stabile miglioramento nelle politiche del controllo delle malattie infettive. In particolare, verranno condotti studi di stima di prevalenza di marcatori infettivi e di tipizzazione molecolare di ceppi isolati in vari gruppi di popolazione dei paesi partecipanti.

Metodologia - Paesi interessati sono Albania, Kosovo, Serbia e Montenegro, Bulgaria e Camerun. Qui vi è una collaborazione anche con l'Università di Tor Vergata, già presente con altri progetti. Le principali patologie in studio sono HIV, Epatiti B, Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST). Il progetto prevede un accordo con il Ministero della Sanità del paese con cui si collabora e normalmente il *partner* è l'omologo Istituto di Sanità Pubblica (ISP) o istituzione simile. Il progetto procede secondo uno schema di lavoro già validato, che è l'identificazione di un responsabile generale del progetto e un referente per ogni area di intervento (epidemiologia, virologia, batteriologia). Vengono congiuntamente organizzati programmi di formazione del personale locale, articolati in sessioni frontali condotte o nel paese o in ISS, oltreché attività di campo supervisionata o di perfezionamento svolta in Italia.

Risultati attesi nel triennio

Miglioramento delle capacità diagnostiche e terapeutiche delle principali malattie trattate in ambito ospedaliero; uso appropriato dei mezzi diagnostici in termini di costo/efficacia. Ampliamento e adeguato monitoraggio del trattamento anti-retrovirale per madri con infezione da HIV, con conseguente riduzione della trasmissione verticale dell'infezione da HIV e miglioramento delle condizioni di salute e sviluppo di madre-bambino.

Miglioramento dei sistemi di sorveglianza delle malattie infettive e dei protocolli di intervento attivo da parte dell'ISP e degli uffici di epidemiologia regionali. Conseguente miglioramento delle capacità di raccolta, analisi e utilizzazione dei dati da parte del Ministero della Sanità e delle strutture periferiche, secondo i livelli di interesse e competenza.

Riqualificazione e potenziamento del personale tecnico-sanitario per lo svolgimento delle attività epidemiologiche e di laboratorio per il controllo delle malattie infettive. Realizzazione di un programma pilota di ECM, con formazione di formatori e metodi di apprendimento a distanza.

La progressiva introduzione di apparecchiature di laboratorio avanzate, con conseguente miglioramento delle capacità diagnostiche locali, va vista come opportunità di aggiornamento professionale e motivazionale del personale locale e in quadro di sviluppo sostenibile della sanità (all'interno di un percorso di sviluppo umano globale) del paese beneficiario.

Trasferibilità dei risultati

Basata anche sull'esperienza acquisita in precedenti progetti, va intesa come assistenza continuativa da parte dell'ISS nel percorso di adesione agli standard dell'Unione Europea, in vista del suo futuro allargamento ai paesi balcanici. Questa può portare ad un'intensificazione di

rapporti di tipo istituzionale, da cui possono derivare ulteriori collaborazioni. Esse possono avvenire nell'ambito della formazione e scambio di personale, nella partecipazione congiunta a progetti internazionali (promossi dalla Commissione Europea, dall'OMS, o da altre organizzazioni internazionali donatrici), ovvero favorendo la collaborazione anche fra strutture decentrate dei paesi beneficiari con Università, Regioni e/o Aziende Ospedaliere italiane - cui può seguire un partneriato fra tali strutture decentrate - o ancora allo sviluppo di collaborazioni in settori non previsti nel presente programma, o all'ampliamento dei paesi *partner*, seguendo la medesima metodologia di lavoro.

Convenzione tra Comune di Roma, Assessorato alle Politiche Ambientali, Dipartimento X e ISS per la "Sorveglianza di *Aedes albopictus* nel comune di Roma"

Aedes albopictus, la zanzara tigre, è presente in Italia dal 1990 e a Roma dal 1997. La specie è di origine orientale, viggia per il mondo grazie alle sue uova all'interno di copertoni usati e è un potente vettore di *arbovirus* agenti di malattie umane e del bestiame. Recentemente in Italia sono stati isolati individui naturalmente infetti con *Dirofilaria repens* e *D. immitis*.

Il progetto si propone di continuare le attività di monitoraggio (raccolta ed elaborazione settimanale dei dati sulla distribuzione e sulla densità relativa di *Aedes albopictus* a Roma) a tutto il 2006. In più, rispetto al precedente biennio, si propongono due ricerche di campo, da condursi in città, la prima durante i mesi caldi, l'altra durante quelli freddi. Il fine è quello di 1) valutare l'effettiva produttività in larve dei tombini stradali nel corso della stagione favorevole allo sviluppo della zanzara, con analisi del costo/beneficio dei trattamenti antilarvali; 2) studio della dinamica di popolazione della zanzara tigre durante i mesi più freddi (dicembre-febbraio) in relazione ai recenti risultati del monitoraggio invernale che hanno dato, senza interruzione alcuna, oltre il 30% di ovitrappele positive ogni settimana.

Programma di attività e Metodi:

- Gestione dell'attività di monitoraggio di *Ae. albopictus* a Roma, condotta tramite 650 stazioni di rilevamento (ovitrappele).
- Elaborazione dei dati raccolti e loro inserimento in un sistema geografico informativo.
- Invio al X Dipartimento di un bollettino settimanale con i dati sulla distribuzione e sulla densità della specie infestante nei diversi settori operativi (oltre 200) nei quali è stata divisa l'area urbana.
- Studi scientifici sulla biologia e il comportamento della specie, in particolare: valutazione dell'efficacia dei trattamenti antilarvali nei tombini condotti di *routine* durante i mesi caldi.
- Consulenza scientifica al X dipartimento

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

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità in "tempo reale" (settimanali) di dati sulla distribuzione e densità relativa della zanzara anche a livello territoriale di Azienda Sanitaria

Costruzione di una banca dati delle sostanze chimiche sensibilizzanti

Realizzazione di una banca dati delle sostanze chimiche sensibilizzanti in collaborazione con il Reparto "Sostanze e preparati pericolosi"-Dip. AMPP e con il Servizio SIDBAE - Settore informatico, dell'Istituto Superiore di Sanità.

Risultati attesi nel triennio

Fruibilità della Banca Dati sul sito web dell'Istituto Superiore di Sanità e quindi disponibilità delle informazioni presenti nella Banca Dati stessa sia per la comunità scientifica che per le industrie.

Trasferibilità dei risultati

Servizio Sanitario Nazionale. Informazioni per il personale esposto a rischio professionale. Informazioni per le industrie.

Descrivere le caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi di Legionella isolati dall'ambiente e dall'uomo contribuendo a migliorare le conoscenze relative alle possibili fonti di infezione

Nel 1983, la legionellosi fu inserita tra le malattie a notifica obbligatoria (DM 07/02/83) e in quell'anno venne istituito presso l'ISS il Registro Nazionale dei Casi di Legionellosi.

Tale sistema assolve ai compiti di registrazione dei casi, ma è inadeguato a descrivere da un punto di vista microbiologico l'epidemiologia dell'infezione, per la quale non è sufficiente identificare l'agente eziologico coinvolto, ma si rende necessaria la sua caratterizzazione e tipizzazione.

Infatti, i dati microbiologici prodotti dai laboratori di primo livello, sia con attività di diagnosi clinica che ambientale (Azienda Provinciale Prevenzione Ambiente, ARPA), non contribuiscono sufficientemente a condurre un'attività di sorveglianza delle infezioni da legionella. Inoltre poiché molto frequentemente, la diagnosi di legionellosi viene effettuata principalmente attraverso la determinazione dell'antigene urinario, che non prevede l'isolamento del germe, non è possibile effettuare il confronto con i ceppi isolati da probabili serbatoi ambientali, né interventi mirati di prevenzione e controllo come indicato nelle linee guida italiane. La sorveglianza di questa infezione richiede quindi che venga incrementata la diagnosi di laboratorio mediante il metodo colturale, supportata poi dalla tipizzazione sia fenotipica che genomica dell'agente isolato. Quest'ultima attività necessita dell'intervento di un laboratorio di riferimento specializzato che operi a livello nazionale, quale quello già attivo presso l'Istituto Superiore di Sanità (Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Legionelle, GU 05/02/05).

Risultati attesi nel triennio

Individuazione di una rete di laboratori ospedalieri per la diagnosi di legionellosi su campioni clinici;

Definire una linea di base, ovvero caratterizzare anche i ceppi precedentemente isolati con nuove metodologie, da poter raffrontare con i ceppi che verranno isolati in futuro;

Caratterizzazione fenotipica e genomica delle legionelle provenienti dai laboratori, utilizzando nuove tecniche molecolari;

Confronto tra le caratteristiche dei ceppi isolati dall'uomo con quelle di ceppi isolati dall'ambiente presso le ARPA.;

Confronto dei dati microbiologici con i dati epidemiologici;

Mappatura geografica dei ceppi di legionella diffusi in Italia, e la possibile individuazione di genotipi maggiormente circolanti o di ceppi endemici;

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti verranno resi noti attraverso la costituzione di una banca dati di genotipi di legionella italiani rapidamente consultabile, attraverso un sito web, sia a livello nazionale che internazionale, senza la necessità di invio di ceppi tra i laboratori in caso di *cluster* epidemici e sarà oggetto inoltre di pubblicazioni scientifiche.

Diagnosi delle candidiasi sistemiche e patogenesi delle candidiasi vaginali

Le infezioni causate da funghi opportunisti sono in continuo aumento e variano da infezioni sistemiche o invasive fatali in pazienti immunocompromessi a infezioni delle mucose che sono quasi comunemente osservate in pazienti affetti da AIDS. Le micosi invasive da funghi opportunisti, soprattutto candidiasi e aspergillosi rappresentano un problema grave ed emergente in pazienti immunocompromessi, come pazienti neutropenici o affetti da vari tipi di neoplasie. In particolare la candidemia si colloca al 4° 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 candidiasi orofaringee e vaginali sono particolarmente rilevanti in pazienti affetti da AIDS. La candidiasi vulvovaginale rappresenta un diffuso problema clinico infatti è molto frequente anche in donne sane ma la sua patogenesi e la risposta immune dell'ospite a livello vaginale non è chiara. Studio della Candidiasi vulvovaginale Le ricerche saranno mirate ad evidenziare i fattori di virulenza di *Candida* che possono aggredire o aggirare le difese dell'ospite come secrezione di enzimi e dimorfismo e la risposta immune anti-*Candida* a livello mucosale. Nel modello di vaginite sperimentale nella ratta abbiamo evidenziato che anticorpi anti-*Candida* e immunità cellulo-mediata vengono indotti a livello vaginale e che questa immunità, limitata alla mucosa vaginale non è associata a risposte periferiche. Sulla base di questi studi abbiamo prodotto proteine ricombinanti (proteinasin, mannoproteina) e/o anticorpi monoclonali da sperimentare per protezione vaccinale e/o terapeutica nel nostro modello sperimentale.

Risultati attesi nel triennio

Miglioramento della diagnosi delle candidiasi invasive. Infatti l'evidenziamento di DNA specifico fungino, direttamente in campioni di sangue nelle micosi invasive, mediante l'applicazione della reazione polimerasica a catena (PCR) e di *Real Time* PCR si pone come metodica alternativa alla tradizionale emocoltura. È attesa la validazione di queste metodologie.

Trasferibilità dei risultati

Miglioramento della diagnosi delle candidiasi invasive

Tali ricerche permetteranno di standardizzare metodi molecolari per la diagnosi di candidiasi invasiva in pazienti leucemici consentendo una diagnosi tempestiva e un approccio terapeutico altrettanto rapido. Questi metodi saranno oggetto di pubblicazioni internazionali e se possibile brevettati, nonché trasferite agli operatori sanitari periferici.

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 candidiasi vaginali refrattarie alla terapia antimicotica

Diagnosi innovativa di infezione tubercolare mediante *test* citometrico 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 del 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 di linfociti T specifici per ESAT-6 e CFP-10 con una metodica citofluorimetrica basata sulla rilevazione di linfociti secernenti attivamente IFN γ e IL-2 dopo stimolazione specifica. Rispetto alla metodica ELISPOT, che comunque verrà utilizzata per paragonare i risultati, la metodica proposta potrebbe permettere non solo la quantizzazione di linfociti T specifici, ma anche di caratterizzarli fenotipicamente per la possibilità di utilizzare contemporaneamente fino a tre anticorpi monoclonali direttamente su sangue intero

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità di un *test* per la diagnosi rapida d'infezione tubercolare con calcolo di sensibilità, specificità valore predittivo positivo e negativo, derivati dall'analisi dei dati ottenuti su pazienti e controlli.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni, comunicazioni a congressi, brevetti

Diagnosi rapida differenziale: strumento indispensabile nelle pandemie influenzali

Le patologie respiratorie possono essere provocate da una molteplicità di agenti infettivi, di natura sia virale che batterica, che spesso possono presentarsi con un quadro clinico simile, sebbene la loro morbilità e mortalità possa essere piuttosto differente.

Tra di esse l'influenza spicca per contagiosità e diffusione e inoltre per la capacità di dare origine a gravi pandemie, come conseguenza di fenomeni di riassortimento genetico tra virus di origine aviaria e virus di origine umana. In anni recenti è emerso che i virus influenzali aviari possono infettare l'uomo anche direttamente, cioè senza riassortimento. I recenti episodi di contagio umano da epidemie di influenza nel pollame (H5N1), verificatesi a partire dal 2003 nei paesi del Sud-Est Asiatico, che hanno provocato numerosi decessi in Thailandia e Vietnam, rappresentano un pericoloso segnale che sottolinea l'importanza di intensificare gli sforzi della sorveglianza in questo settore.

Risulta quindi evidente come sia fondamentale poter disporre di metodiche che permettano di individuare rapidamente il virus responsabile della patologia osservata, sia in periodi interpandemici che, specialmente, nel caso di pandemie.

Tra queste la *real-time* PCR permette la ricerca rapida e simultanea di più patogeni nello stesso campione (*multiplex* PCR), cosa è particolarmente importante nel caso di diagnosi dubbia. Un altro vantaggio offerto dalla *real-time* PCR è la possibilità di effettuare analisi volte a determinare la presenza di mutazioni correlate con la diversa patogenicità di un dato microorganismo, o il sottotipo virale implicato.

Risultati attesi nel triennio

Programma di attività e Metodi:

La messa a punto della metodica di *real-time* PCR *multiplex* per l'analisi rapida differenziale di campioni clinici di pazienti con infezione delle vie respiratorie, avverrà attraverso:

Raccolta dei campioni clinici (tampone naso-faringeo e/o gargarizzato)

Estrazione dell'RNA virale mediante *kit* commerciali

Sintesi del cDNA mediante *random examers* o *primers* specifici

Selezione di *primers* e sonde in regioni conservate del gene codificante la proteina della matrice (M) del virus dell'influenza A e dell'influenza B, mediante allineamento nucleotidico RT-PCR (*reverse-transcription-PCR*) dei campioni raccolti
Real-time PCR mediante *Roche Light-Cycler* in presenza di *Syber green* e analisi delle curve di *melting*

Confronto delle due metodiche di PCR e determinazione delle specificità e sensibilità di entrambe

Ulteriore analisi dei campioni positivi per influenza A, per la determinazione del sottotipo virale. Tale analisi verrà effettuata mediante la messa a punto di *Real-time* PCR, con sonde di ibridazione (*HybProbes*) e analisi delle curve di *melting*

Sequenziamento degli amplificati per verificare l'identificazione dei sottotipi antigenici

Diffusione del protocollo operativo di *Real-time* PCR alla rete già esistente di laboratori periferici, anche attraverso eventuali periodi di *training* di personale esterno presso l'ISS.

Il presente progetto si propone di mettere a punto una metodica di *real-time* PCR *multiplex* per l'analisi rapida differenziale di campioni clinici di pazienti con infezione acuta delle vie respiratorie e, in particolare, per discriminare tra ceppi influenzali umani, ceppi aviari e ceppi riassortanti in caso di emergenza pandemica e stabilire il rischio reale per la popolazione. In un secondo tempo si prevede la diffusione di tale metodica alla rete già esistente di laboratori periferici, afferenti al già esistente sistema di sorveglianza dell'influenza.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle ricerche saranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni scientifiche e partecipazione a congressi.

Diagnostica, patogenesi e immunità delle malattie cronico-degenerative da *Chlamydia pneumoniae*

Validazione delle metodiche immunoenzimatiche in soggetti aterosclerotici, con particolare riguardo ai pazienti con angina instabile e infarto acuto del miocardio. - Ruolo di particolari antigeni di *C. pneumoniae* (HSP60, OMP2 e fosfolipasi) nella patogenesi dell'infezione cronica clamidiale. Utilizzazione delle tecniche di *microarrays* per l'individuazione di antigeni immunodominanti con potenziale vaccinale. Modelli sperimentali d'infezione da *C. pneumoniae* nella patologia ischemica. - Studio della maturazione e differenziamento delle cellule dendritiche stimulate da antigeni clamidiali.

Risultati attesi nel triennio

Validazione e standardizzazione di metodi immunoenzimatici nella diagnostica di *C. pneumoniae* in particolare attraverso l'uso di antigeni ricombinanti del batterio, soprattutto ai fini della prognosi delle malattie cardiovascolari sostenute da *C.pneumoniae*. Comprensione della risposta immunitaria a *C. pneumoniae* in particolare HSP60, nella patogenesi delle malattie ischemiche, e utilizzazione clinica delle tecniche di *microarray*. Individuazione di candidati vaccinali per le patologie da *C. pneumoniae*.

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità dei risultati alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni indexate. *Transfer* tecnologico ai laboratori del Servizio Sanitario Nazionale. Formazione tecnologica intra ed extramurale.

Discovery di adiuvanti innovativi per la formulazione di vaccini mucosali e sistemici

Lo sviluppo di vaccini mucosali è auspicabile non solo per le caratteristiche di somministrazione non invasiva di tali vaccini, ma anche perché l'immunizzazione mucosale induce IgA secretorie che possono prevenire la colonizzazione delle mucose da parte dei patogeni. Lo sviluppo di vaccini mucosali richiede l'utilizzo di adiuvanti specifici per amplificare la risposta immunitaria verso antigeni solubili. Nonostante vari candidati siano stati identificati, ad oggi non è stato autorizzato nessun adiuvante mucosale per uso umano. Il problema principale nel campo degli adiuvanti è la tossicità che molto spesso è associata a una buona efficacia. Un altro problema è la complessità delle molecole proposte e la difficoltà di chiarire il loro meccanismo d'azione. Inoltre, la tossicità di alcuni adiuvanti è dovuta al fatto che questi sono molecole di origine microbica che si sono evolute per danneggiare l'ospite. Lo scopo del nostro progetto è quello di identificare nuovi adiuvanti mucosali di natura semplice, come peptidi sintetici, e con un'attività biologica ben definita. Inoltre il nostro approccio è quello di identificare molecole endogene, prodotte cioè da cellule di mammiferi, che non dovrebbero avere effetti dannosi quando somministrate all'uomo.

Sostanze (proteine e peptidi) di origine microbica o di origine endogena saranno selezionate e saggiate per l'attività adiuvante non solo per via mucosale ma anche per via sistemica. Lo *screening* sarà effettuato in topi con antigeni di origine batterica o virale. Le molecole con attività adiuvante saranno caratterizzate sia *in vivo* che *in vitro* per il loro meccanismo d'azione e per i loro effetti su cellule del sistema immunitario.

Risultati attesi nel triennio

Questo studio può portare alla brevettazione di uno o più nuovi adiuvanti oltre che a nuove combinazioni antigene/adiuvante da utilizzare per lo sviluppo di vaccini contro malattie infettive.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di tale studio potranno offrire alla comunità scientifica adiuvanti nuovi nella loro natura e quindi di nuova generazione per formulare vaccini efficaci e non tossici. Gli adiuvanti peptidici offrono diversi vantaggi tra cui quello di potere essere ottenuti sinteticamente ed essere quindi privi di LPS, un contaminante tossico di molti vaccini. I risultati dei nostri studi saranno pubblicati su riviste internazionali e potranno le basi per ulteriori collaborazioni in ambito accademico e industriale.

Disregolazione del sistema immunitario: analisi dei meccanismi cellulari che intervengono nelle patologie autoimmuni e da allergia

Tra le varie condizioni di disregolazione che si possono generare a carico del sistema immunitario, quelle che sono oggetto del presente studio possono essere ricondotte ai seguenti schemi: perdita di tolleranza verso microrganismi non patogeni (ad es. flora intestinale); risposte immunitarie dirette contro strutture *self*; risposte immunitarie verso molecole ambientali normalmente innocue (allergeni). Gli obiettivi sono: lo studio delle variazioni dell'omeostasi immunitaria nel corso di infiammazioni croniche su base immunitaria; l'analisi della possibile associazione di tali patologie con vari microrganismi o con la presenza di particolari antigeni; la valutazione delle possibilità di intervento in funzione del quadro immunologico riscontrato. Per affrontare tali aspetti, il presente progetto si propone di studiare vari modelli di patologie causate da una impropria risposta immunitaria, caratterizzate sia da una aggressione impropria verso il *self* o verso antigeni normalmente irrilevanti, sia verso molecole crossreattive con il *self* stesso. In particolare, verranno considerate le patologie autoimmuni e quelle allergiche, che sono appunto causate entrambe da una disregolazione del sistema. Pertanto, per quanto riguarda

le patologie autoimmuni, la disregolazione verrà studiata nelle patologie croniche intestinali (morbo di Crohn e colite ulcerosa), nella aterosclerosi e nell'ulcera, valutando la presenza di una reattività verso antigeni *self* e della induzione di tale risposta da parte di microrganismi quali *H. Pylori*, e nel diabete.

Risultati attesi nel triennio

Le Unità Operative afferenti a questo primo WP valuteranno l'importanza di alcuni aspetti di recente acquisizione scientifica, quali il ruolo del CD38 di recente dimostrato sulle cellule dendritiche e del CTLA-4, la cui frazione solubile è stata associata a possibili fenomeni di tipo immunitario. Inoltre, verranno valutate molecole quali il TGF-beta nel Morbo di Crohn e il diltiazem in soggetti saniciome potenziali approcci terapeutici per controllare la patologia immunomediata. Un secondo WP si occupa di Microrganismi e disregolazione del SI, e la ricerca afferente a questo WP valuta vari aspetti legati alla disregolazione del sistema immunitario direttamente o indirettamente associate alla presenza di microrganismi. In particolare, di interesse il ruolo dei microrganismi non patogeni nella induzione delle allergie respiratorie e patogeni e non patogeni nella induzione della disregolazione responsabile di patologie quali il diabete, l'aterosclerosi e l'ulcera, le malattie infiammatorie croniche intestinali. Infine un terzo WP si occupa di molecole ambientali irrilevanti e disregolazione del SI e dovrà chiarire i meccanismi alla base della azione dannosa per l'ospite presente nel corso di una risposta immunitaria contro molecole ambientali ubiquitarie irrilevanti, che diventano allergeniche, quali i pollini e il nichel, ovvero verso molecole endogene (self).

Trasferibilità dei risultati

Il progetto non è ancora concluso. Una importante conclusione del WP 1 è che cellule stimulate con TGF-beta producevano forme attive di caspasi se prelevate da aree intestinali indenni, mentre producevano Smad7 se prelevate da aree di soggetti con Malattia di Crohn. Anche la dimostrazione che il diltiazem può ridurre la produzione di IL-6 è di potenziale interesse quanto a trasferibilità. Nel caso del WP2, microrganismi non patogeni e patogeni possono avere un ruolo importante nella genesi delle patologie da allergia. Tale risultato può influenzare approcci terapeutici di grande interesse, e risulta chiara la mancanza di associazione tra patologia da allergia e vaccinazioni o malattie infettive quali morbillo, parotite, rosolia, varicella e pertosse. Di grande interesse risulta essere l'utilizzo di probiotici in relazione all'aumento della permeabilità mucosale nell'ambito delle patologie croniche quali il Crohn. Infine, si conferma importante il ruolo di molecole a basso peso molecolare quali il nichel e di molecole ricombinanti opportunamente selezionate nella induzione di patologie allergiche e nel loro trattamento.

Effetti della somministrazione mucosale di batteri probiotici sulla prevenzione e/o la terapia delle patologie allergiche in modelli murini di sensibilizzazione verso allergeni inalanti e alimentari

La prevalenza delle patologie allergiche soprattutto di tipo respiratorio è in continuo aumento nei Paesi ad elevato sviluppo economico. L'immunoterapia specifica (SIT) costituisce tuttora l'unico intervento in grado di modificare stabilmente e in modo specifico la reattività immunologica dell'individuo trattato verso gli allergeni responsabili. Nonostante la documentata efficacia della SIT e il suo esteso impiego, sussistono alcuni inconvenienti legati alla via parenterale di somministrazione e alla possibilità di reazioni avverse. Infatti, l'adiuvante comunemente usato nella SIT, l'allume, è un potente induttore di risposte Th2 che può interferire negativamente con il trattamento terapeutico. Esiste perciò un crescente interesse nella ricerca di nuovi adiuvanti o immunomodulatori che non orientino ulteriormente la risposta del paziente in senso Th2, insieme alla possibilità di esplorare altre vie meno invasive di

somministrazione, come quella mucosale. Recenti studi epidemiologici supportati da *trial* clinici suggeriscono un possibile ruolo esercitato da alcuni ceppi di batteri lattici nella prevenzione delle patologie allergiche, mentre sono ancora scarsi gli studi sperimentali che dimostrino gli effetti preventivi o terapeutici di questo trattamento sulla risposta IgE allergene-specifica. La disponibilità di modelli murini di sensibilizzazione verso allergeni inalanti e alimentari costituirebbe quindi uno strumento utile nel quale valutare l'efficacia del trattamento mucosale con batteri probiotici, e soprattutto comprendere i meccanismi immunologici umorali e cellulari indotti dai batteri e dai loro prodotti. In questo senso, essendo note le diverse attività modulatorie di ceppi differenti di batteri probiotici, spesso mutuamente antagoniste, è di particolare interesse la valutazione *in vivo* dell'effetto della somministrazione di miscele bilanciate di ceppi diversi.

La ricerca si propone i seguenti obiettivi:

- induzione e caratterizzazione di modelli murini di sensibilizzazione allergica verso allergeni inalanti e alimentari;
- studio dell'attività immunomodulatoria preventiva e/o terapeutica nei modelli murini di cui al punto precedente, indotta da somministrazioni mucosali di batteri probiotici, con o senza l'associazione di molecole allergeniche mutate in senso ipoallergenico.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone di fornire nuove conoscenze nell'ambito dell'utilizzo di batteri e loro componenti o prodotti nella terapia delle malattie allergiche al fine di:

approfondire il meccanismo di azione di batteri probiotici e loro prodotti,

ottimizzare il loro utilizzo nella terapia e/o nella profilassi grazie all'impiego in modelli di sensibilizzazione allergica ad antigeni inalanti e alimentari.

Trasferibilità dei risultati

La ricerca si propone di originare due tipi di risultati o prodotti potenzialmente trasferibili alla pratica clinica e al SSN a breve-medio termine:

1) Nuovi strumenti terapeutici per il controllo delle patologie allergiche, il cui meccanismo patogenetico è basato sulla disregolazione del sistema immunitario e sulle complesse interazioni tra sistema immunitario e stimoli da parte di microrganismi. Tali strumenti comprendono batteri probiotici e loro componenti e nuove molecole ipoallergeniche, e hanno in comune una attività immunomodulatoria connessa alla capacità di agire su cellule dendritiche e di indurre cellule T regolatorie.

2) Definizione di parametri e di linee-guida per la selezione dei pazienti e il loro indirizzo alla strategia terapeutica più vantaggiosa.

Effetti di allergeni pollinici dotati di attività anti-microbica su cellule del sistema immunitario, con particolare riferimento a cellule dendritiche e cellule NK

L'incidenza delle malattie atopiche è cresciuta drammaticamente negli ultimi 50 anni. 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 receptors* (PRR), queste cellule sono anche le uniche ad essere sensibili ai prodotti microbici. Questo progetto si propone di studiare gli effetti di Par j 1, l'allergene maggiore di *Parietaria judaica* con probabile affinità per i prodotti microbici, sulle cellule coinvolte nella risposta allergica e/o normale come appunto le cellule dendritiche ma anche le cellule NK e T regolatorie. L'ipotesi centrale di questo progetto è che l'esposizione ad allergeni, in particolare a Par j 1, porti ad un diverso programma di differenziazione funzionale delle cellule del sistema immunitario coinvolte nella risposta allergica nei soggetti normali o allergici.

Risultati attesi nel triennio

Lo sviluppo di questo progetto avverrà in due fasi: una prima che potrebbe coinvolgere studi *in vitro* con lo studio degli effetti del Par j 1 su cellule miste del sistema immunitario (splenociti), su sottopopolazioni distinte quali DC (derivate dal midollo osseo con fattori di crescita o dalla milza) e/o NK-T cells e su 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 j 1. Inoltre, attraverso l'utilizzo di cellule derivate da topi mutanti o deficitari per i vari PRRs (e.g. C3H/HeJ, MyD88 KO ecc.) si potrà caratterizzare la reale correlazione del Par j 1 con i prodotti microbici. Successivamente gli studi *in vitro* si potranno trasferire su cellule umane da soggetti allergici e/o normali. Tutti i punti su citati si baseranno sull'utilizzo e la messa a punto di metodiche di immunobiologia cellulare, immunobiochimica e biologia molecolare volte a caratterizzare il fenotipo e la funzionalità delle singole popolazioni cellulari.

In una seconda fase il progetto si trasferirà allo studio della risposta *in vivo* attraverso l'ottimizzazione e la standardizzazione di un modello murino di allergia a *Parietaria* e alla modulazione della risposta allergica con l'utilizzo di allergeni *wild type* o mutati nella loro porzione funzionale oppure con l'impiego di topi mutati come citato sopra.

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.

Effetto della somministrazione di antisense-SMAD7 nelle coliti sperimentali

A livello della mucosa intestinale, a seguito della colonizzazione del tratto intestinale si stabilisce uno stato di infiammazione "controllata" che permette una convivenza pacifica con mutuo vantaggio. Il "controllo" dell'infiammazione si attua attraverso cellule e citochine regolatorie fra le quali il TGF-beta ha un ruolo prevalente. Le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (morbo di Crohn e colite ulcerosa) risultano da un'alterazione delle interazioni con la flora batterica conseguente a un *deficit* relativo o assoluto dei meccanismi regolatori. Recentemente è stata dimostrata l'esistenza, in questi pazienti, di un *deficit* di trasmissione intracellulare del segnale del TGF-beta. Questa alterazione si associa ad alti livelli intracellulari di SMAD 7, responsabile del blocco della trasmissione del segnale dal recettore. Il progetto ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia terapeutica della somministrazione di antisense anti SMAD 7 nelle coliti sperimentali.

Risultati attesi nel triennio

Validazione della somministrazione dell'antisense come modalità per indurre remissione clinica e istologica della colite.

Trasferibilità dei risultati

Studio preclinico di efficacia propeutico alla sperimentazione clinica in pazienti con morbo di Crohn e Colite ulcerosa.

Emergenza di ceppi varianti di *Clostridium difficile* responsabili di diarree nosocomiali ad elevata morbilità e mortalità

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.J.Me 2005,353:2442-49;CID 2005,41; The Lancet 2005,366:1053) al controllo di specifici fenotipi responsabili di *outbreak* di particolare gravità. Studi preceenti 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 in collaborazione con *partner* europei e recentemente inviato all'ultima call del FP6-2005-LifeScience si propone di:

1) caratterizzare ceppi di *C.difficile* ipervirulenti e antibiotico resistenti isolati in Europa per stabilire il ruolo della delezione nel gene regolatore 2) definire target molecolari appropriati per *test* diagnostici 3) conoscere i fattori di rischio che consentono una più elevata circolazione di ceppi ipervirulenti 4) 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 di *C.difficile* circolanti in Europa; la definizione del ruolo svolto dall'alterazione nel gene *tcdC* nel rendere i ceppi più virulenti; 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.

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: 1) valutazione e quantificazione dei fattori globali, climatici e ambientali, determinanti nella diffusione delle varie specie e popolazioni di flebotomo vettore; 2) formulazione delle prime mappe di rischio pan-europee 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 3 datatabase storici (1965-2005) su: i) identificazione e distribuzione delle specie e popolazioni 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 indagine mirate (2006-2008) 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 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 ambientali sulla diffusione e abbondanza dei flebotomi vettori e sulla distribuzione di ceppi di *L. infantum* causa di leishmaniosi umana e canina;

Formulazione delle prime mappe di rischio ad alta risoluzione sulla distribuzione geografica delle specie e ceppi di *Leishmania* causa di leishmaniosi 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'altrimetria 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.

**Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN):
Monitoraggio di malattie parassitarie trasmesse da vettori e zoonotiche**

Recentemente malattie parassitarie trasmesse da vettori e zoonotiche sono (ri)emerse e diffuse in Europa con conseguenze sanitarie, ecologiche, socio-economiche e politiche. Cause di tali emergenze sono state trovate in modifiche ambientali locali dovute sia a cambiamenti climatici che provocati dall'uomo. L'Europa volendo prevenire e controllare future emergenze ha creato il progetto EDEN con scopo la previsione dell'impatto generale delle modifiche ambientali sulla sanità umana. Il progetto, articolato in un consorzio di 47 istituzioni e 24 paesi, presenta come principale obiettivo quello di sviluppare e standardizzare procedure utili per la previsione di modelli di diffusione e emergenza di un gruppo di malattie umane selezionate come indicatori. I dati ottenuti computati con dati spaziali e epidemiologici permetteranno la costruzione di mappe di rischio ad alta risoluzione. Le malattie sono: i) endemiche in Europa (es. Leishmaniosi); ii) eradicata (Malaria); iii) segnalate ai confini europei (*Rift Valley Fever*) in

regioni africane. Il progetto risulta così organizzato in 6 Sottoprogetti verticali (malattie) in cui l' ISS partecipa come *partner*, in due come responsabile (Leishmaniosi e Malaria) e in uno come partecipante (*West Nile Virus*). Tali sottoprogetti coordinati secondo lo stesso indirizzo scientifico si riuniscono in attività orizzontali integrative che portano al monitoraggio dei cambiamenti ambientali, *modelling* delle malattie, informazione e comunicazione.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione e quantificazione dei ruoli dei fattori climatici e ambientali sulla diffusione e abbondanza degli insetti vettori.

Valutazione della diffusione di 6 malattie parassitarie e zoonotiche (Leishmaniosi, Malattie trasmesse da zecche, Malattie virali dei roditori, Malaria, *West Nile Fever*, Malattie di origine Africana) selezionate all'interno del progetto EDEN.

Formulazione delle prime mappe di rischio ad alta risoluzione sulla distribuzione geografica delle 6 malattie selezionate all'interno del progetto EDEN.

Trasferibilità dei risultati

Sorveglianza e controllo della diffusione delle 6 malattie selezionate all'interno del progetto EDEN in Italia.

Entomologia medica: biodinamica e studi di popolazione degli insetti vettori di malattie.

Standardizzazione dell'identificazione dell'agente eziologico e della diagnosi della rispettiva malattia.

Formulazione di mappe di rischio di diffusione in Italia delle malattie parassitarie e zoonotiche identificate all'interno del progetto EDEN.

Epidemiologia delle infezioni emergenti e riemergenti in fasce deboli della popolazione, in particolare immigrati e persone senza fissa dimora

Introduzione - La presente ricerca si inserisce nell'ambito dell'analisi epidemiologica delle principali "patologie da disagio sociale" o "malattie della povertà". Per cui, accanto ai disturbi più propriamente socio-comportamentali quali disordini psichiatrici e dipendenze, sono oggetto d'indagine patologie infettive: Tuberculosis (tbc), HIV/AIDS, Epatiti B e C, altre Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) sia virali (HPV, HHV8, HHV2) che batteriche (sifilide, blenorragia), come pure dermatosi batteriche e micotiche. Di particolare interesse è la stima della circolazione di *Mycobacterium* in Italia in sottogruppi più vulnerabili, nell'ipotesi che condizioni di degrado ambientale e riduzione delle difese immunitarie possono determinare aumento della circolazione del *Mycobacterium* anche in Italia.

Obiettivi - stimare le patologie infettive di più frequente riscontro in un campione di soggetti fragili.

Metodologia - A tutte le persone senza dimora e a immigrati che consecutivamente si presentano presso l'ambulatorio dell'istituzione clinica *partner* (l'IRCCS IFO S.Gallicano) verrà chiesto di partecipare allo studio, rispondendo ad un questionario che indaga le principali caratteristiche socio-demografiche, comportamentali, economiche e ambientali. Le diagnosi sono codificate seguendo la classificazione internazionale delle malattie ICD-IX. L'analisi dei dati verrà eseguita utilizzando opportuno *software* e per la valutazione statistica si applicheranno appropriati *test*.

Risultati attesi nel triennio

Il profilo immunoinfettivologico maggiormente rappresentato nei soggetti in stato di deprivazione e a rischio di povertà, anche attraverso un approccio interdisciplinare, interculturale e interistituzionale fra servizio sanitario pubblico e organizzazioni sociali e del volontariato, in un'ottica di sviluppo sostenibile e progressiva integrazione con la realtà italiana, all'interno di un percorso di sviluppo umano globale.

Stima di prevalenza e – in misura più limitata - incidenza di tali marcatori infettivi.

Miglioramento dei sistemi di sorveglianza delle malattie infettive e dei protocolli di intervento in gruppi di popolazione fragili, in collaborazione con le altre istituzioni pubbliche e di privato-sociale che in Italia e Unione Europea si occupano di immigrati e persone senza fissa dimora.

Riqualificazione e potenziamento del personale tecnico-sanitario per lo svolgimento delle attività epidemiologiche e di laboratorio per il controllo delle malattie infettive per i gruppi fragili della popolazione italiana, che può strutturarsi come percorso formativo pilota di ECM per operatori sanitari che seguono soggetti deboli della popolazione.

Integrazione con i sistemi di sorveglianza e contributo ai protocolli epidemiologici dell'Unione Europea sui soggetti fragili.

Trasferibilità dei risultati

La presente ricerca potrà solamente realizzare e validare un modello operativo, da intendersi come sperimentazione di un modello di intervento socio-sanitario integrato e ripetibile in cui le strutture del Servizio Sanitario Nazionale e le organizzazioni sociali e del volontariato collaborino al fine di prevenire e ridurre le conseguenze negative sulla salute determinate dalla povertà e dall'emarginazione. Questa può portare a un'intensificazione di rapporti di tipo istituzionale, da cui possono derivare ulteriori collaborazioni, che possono avvenire nell'ambito della formazione e scambio di personale. Il mantenimento continuato nel tempo di tale strumento di informazione e di servizio esula dalla presente ricerca (e ha bisogno di risorse qualitativamente e quantitativamente diverse da quelle di un progetto di ricerca); l'ISS può tuttavia offrire assistenza tecnico-scientifica continuativa anche nell'ipotesi di una creazione di un sistema informativo più strutturato.

Epidemiologia molecolare della resistenza ad antimicrobici in patogeni zoonosici

L'aumento delle resistenze agli antibiotici sia in medicina umana che veterinaria è un fenomeno che ha raggiunto proporzioni preoccupanti per vastità e rapidità di diffusione. La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza nei batteri di origine animale è considerata fondamentale per monitorarne la diffusione e per tracciare l'epidemiologia delle infezioni di origine animale.

Le classi di determinanti di resistenza di maggior impatto sono i fattori di resistenza ai beta lattamici a spettro esteso (ESBLs), ai fluorochinolonici, e agli aminoglicosidi. È dimostrato che il trasferimento orizzontale dei fattori di resistenza è un fenomeno che contribuisce allo scambio di determinanti di resistenza tra specie batteriche di diversa origine.

Lo scopo di questo progetto è quello utilizzare metodiche molecolari atte ad evidenziare la presenza di specifici determinanti genetici di resistenza, inclusi i geni che conferiscono resistenza a farmaci rilevanti per la terapia umana e gli elementi che ne promuovono la diffusione orizzontale in isolati batterici di origine zoonosica (principalmente *Salmonella* spp. e *E. coli*). L'obiettivo di queste analisi è quello di ottenere una caratterizzazione molecolare a scopo epidemiologico dei fenotipi di resistenza più ricorrenti nei principali patogeni circolanti in comunità.

Risultati attesi nel triennio

1-Rilevamento di geni di resistenza, in particolare di beta-lattamasi a spettro esteso di classe A (ESBLs di tipo CTX-M, TEM, SHV) e altre beta lattamasi plasmidiche di particolare rilievo (CMY e FOX). In particolare è previsto lo sviluppo di protocolli di PCR con specifici *primers* per i succitati geni di resistenza, con successivo sequenziamento degli ampliconi e analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche ottenute. Queste analisi verranno eseguite su collezioni retrospettive e prospettive di isolati di origine umana e veterinaria (in collaborazione

con gli Istituti Zooprofilattici, Progetto Ricerca Corrente 2004 e con la rete di sorveglianza internazionale ENTERNET).

2-Per i determinanti di resistenza agli aminoglicosidi, l'attenzione è focalizzata al monitoraggio di un particolare meccanismo di resistenza mediato da metilazione dell'rRNA 16S, su una collezione di ceppi zoonotici di origine europea (progetto EU, MeNetVet, WP29-2005-2006). Mediante metodiche molecolari di PCR sarà possibile tracciare l'epidemiologia molecolare della resistenza agli aminoglicosidi, mediata da metilasi.

3-Rilevamento degli elementi genetici mobili che mobilizzano i geni di resistenza (progetto EU, MeNetVet, WP21-2005-2006)

Trasferibilità dei risultati

La rilevazione degli elementi genetici più diffusi responsabili di resistenza antibiotici beta-lattamici e aminoglicosidi, in batteri di origine zoonotica, consentirà di tracciare l'epidemiologia molecolare della resistenza a tali antibiotici a livello nazionale ed europeo. Il trasferimento di tali conoscenze si attuerà attraverso distribuzione di protocolli *standard* agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali per effettuare i *test* di rilevamento genotipico di tali resistenze, al fine di implementare gli attuali strumenti diagnostici. Il trasferimento di tali conoscenze consentirà la creazione di un sistema di laboratorio integrato per la sorveglianza delle antibiotico-resistenze emergenti in Sanità Pubblica e in Sanità animale.

Epidemiologia molecolare delle infezioni parassitarie trasmesse con gli alimenti

L'uomo è afflitto da numerose patologie gastroenteriche e tissutali di origine parassitaria causate da protozoi e elminti acquisiti attraverso gli alimenti, inclusa l'acqua. Malgrado le procedure messe in atto nella preparazione e controllo degli alimenti per prevenire la trasmissione all'uomo, la prevalenza di queste infezioni rimane elevata in Europa e in Italia.

In Italia la criptosporidiosi e giardiasi rappresentano il 5% delle gastroenteriti di origine protozoaria. La mancanza di una terapia di scelta nella cura della criptosporidiosi rappresenta un grave pericolo per i soggetti affetti da diverse forme di immunodepressione, farmacologica (terapia trapianti) o infettiva (HIV). Tra le infezioni elmintiche l'echinococcosi cistica (*Echinococcus granulosus*) e la trichinellosi conservano un ruolo importante nel quadro parassitologico italiano (migliaia di ospedalizzazioni per anno). Preoccupante inoltre è la recente comparsa dell'echinococcosi alveolare (*E. multilocularis*) nelle aree alpine, introdotta, probabilmente, dalle regioni transalpine dove l'infezione è endemica. Studi molecolari hanno dimostrato che la trichinellosi in Italia è causata sia dal consumo di carni di importazione che di produzione nazionale. In questi ultimi anni lo sviluppo di tecniche di amplificazione molecolare e sequenziamento hanno dato un grande impulso alle conoscenze sulle vie di trasmissione di questi patogeni all'uomo e hanno permesso di distinguere le specie o i genotipi zoonotici da quelli esclusivi degli animali.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione e caratterizzazione di alleli con valenza di marcatori molecolari capaci di descrivere la struttura genetica dei parassiti protozoi e elminti sotto studio. Rilevante sarà l'individuazione di *pool* genetici "riconducibili" ad aspetti biologici (specificità d'ospite, modalità di trasmissione, ecc.) o ecologici (distribuzione geografica) che possano fare pensare all'esistenza di entità tassonomiche distinte. Aspetto, quest'ultimo, importante per la piena comprensione dell'epidemiologia della patologia e per una corretta impostazione di misure di controllo.

Identificazione e caratterizzazione di marcatori molecolari per la definizione di un *fingerprint* genetico per operare la tracciabilità delle fonti di contaminazione e/o dell'origine degli alimenti contaminati ("*from fork to farm*").

Validazione e standardizzazione di test molecolari per l'identificazione di *Cryptosporidium* e *Giardia* in diverse matrici.

Identificazione dei genotipi di *Echinococcus granulosus* circolanti sul territorio nazionale e standardizzazione di un *test* di coprodiagnosi nell'ospite definitivo (cane).

Valutazione della prevalenza di *Echinococcus multilocularis* in alcune aree dell'arco alpino e identificazione degli ospiti intermedi di *E. multilocularis* in almeno una provincia dell'Italia settentrionale.

Preparazione di una mappa europea della distribuzione degli alleli di *Trichinella spiralis* che identifichino gli isolati circolanti in aree geografiche definite.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà a informare il personale del 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.

European vigilance Network for the management of antiviral drug resistance - VIRGIL

Il principale obiettivo del ViRgil consiste nella realizzazione della prima "Rete Europea di Vigilanza" capace di valutare il fenomeno della resistenza a farmaci antivirali, usati per diverse infezioni virali, quali influenza, epatiti ecc.

Nel caso dell'influenza la vaccinazione rimane il mezzo migliore di controllo e prevenzione. È possibile tuttavia utilizzare farmaci ad azione antivirale per la profilassi e il trattamento delle infezioni da virus influenzali. Sono disponibili farmaci appartenenti a due diverse classi: l'amantadina e la rimantadina appartengono agli Inibitori della M2 e sono efficaci solo sull'infezione influenzale provocata dai virus di tipo A. Zanamivir e oseltamivir sono farmaci di ultima generazione, in grado di inibire l'attività enzimatica delle neuraminidasi, proteine virali implicate nelle fasi tardive del ciclo replicativo e coinvolte in particolare nel rilascio della progenie virale nell'ambiente extra-cellulare e quindi nella progressione dell'infezione.

È nota l'emergenza di ceppi resistenti in pazienti trattati con i farmaci prima generazione, ma recentemente è stata anche evidenziata l'insorgenza di mutanti resistenti anche agli inibitori della neuraminidasi.

In vista di una eventuale futura pandemia influenzale e ipotizzando la mancanza di un vaccino adeguato nelle prime fasi, risulta fondamentale il corretto uso di farmaci antinfluenzali al fine di evitare l'emergenza di ceppi resistenti. Durante i periodi interpandemici, e ancor più nell'eventualità di una pandemia, risulta fondamentale ampliare le attuali conoscenze sulla frequenza di emergenza di virus resistenti al farmaco, sulla loro diffusione e persistenza nella popolazione.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto suindicato mira a integrare in un'unica rete interattiva le attuali conoscenze e capacità disponibili, a livello europeo, nello studio della farmaco-resistenza riguardo a tre principali malattie virali (Influenza, Epatite B e Epatite C).

Il Progetto si propone di valutare la reale dimensione del fenomeno della resistenza all'Oseltamivir di ceppi influenzali circolanti in periodo epidemico in Europa.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle ricerche saranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni scientifiche e partecipazione a congressi.

GA²LEN, Global Allergy and Asthma European Network

GA²LEN è un “*Network of Excellence*” per l’allergia e l’asma, selezionato dalla Commissione Europea nell’ambito del VII Programma quadro con lo scopo di integrare le competenze di centri di ricerca di eccellenza nel settore, accelerare l’applicazione dei risultati della ricerca alla pratica clinica, ai bisogni dei pazienti e alle scelte strategiche.

Il *network* comprende ricerche epidemiologiche, cliniche e di base, e si propone di studiare l’allergia e l’asma con particolare attenzione alle interazioni tra fattori genetici e ambientali, e al passaggio da sensibilizzazione allergica a malattia e poi a malattia cronica.

Il programma di ricerca GA²LEN consiste di diversi *workpackages* focalizzati su argomenti specifici. Nutrizione, infezioni, inquinamento ambientale esterno e interno, allergie occupazionali, genere, sensibilizzazione IgE e patologia allergica, *remodeling* delle vie respiratorie, terapia clinica, genetica e genomica.

Il nostro gruppo sulle allergie è stato recentemente accolto come uno dei “*collaborating research centres*” nell’ambito del GA²LEN, per sviluppare studi sulla sensibilizzazione allergica e sulla sua immunomodulazione in modelli animali.

Risultati attesi nel triennio

Migliore comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano la produzione delle IgE; identificazione di molecole immunomodulatorie con potenziale terapeutico per l’allergia e l’asma.

Trasferibilità dei risultati

Il raggiungimento dei risultati, grazie anche all’interazione tra competenze diverse e complementari dei gruppi partecipanti, consentirà così di sviluppare nuovi *biomarker*, nonché strategie preventive e terapeutiche innovative

Genomica funzionale e farmacogenomica del Plasmodio della malaria per la identificazione di nuovi bersagli farmacologici, e il disegno e validazione di nuovi antimalarici

Il progetto intende integrare le competenze e le piattaforme tecnologiche in genomica funzionale (*microarray*, proteomica), bioinformatica, biochimica, farmacologia, disegno e *screening* di antimalarici, presenti in diversi laboratori afferenti ad Istituzioni pubbliche e private per la ricerca di nuove strategie di intervento contro la malaria. La ricerca sarà incentrata sulla individuazione di nuovi bersagli, su aspetti di biologia fondamentale della risposta del parassita al trattamento farmacologico e su aspetti applicativi di validazione, *screening* e miglioramento funzionale di composti con attività antimalarica. Le competenze dei gruppi afferenti al progetto consentiranno il disegno e la sintesi di nuove molecole, la valutazione della loro tossicità, specificità, affinità e efficacia come farmaci antiplasmodici

Risultati attesi nel triennio

Individuazione di nuovi bersagli farmacologici del parassita. Analisi tramite *microarray* dell’espressione globale del parassita in risposta ai farmaci. Analisi delle componenti proteiche di microdomini di membrana (*rafts*) del parassita. Identificazione di potenziali sequenze *target* di farmaci che legano il DNA. Studio del meccanismo d’azione di farmaci antimalarici che agiscono con un meccanismo ossido-riduttivo. Ricerca di nuovi principi attivi in composti di origine naturale

Trasferibilità dei risultati

Identificazione e validazione dei potenziali *target* farmacologici. Individuazione di geni specificamente regolati in seguito a trattamento farmacologico. Disegno e sintesi di molecole che legano specificamente il DNA del parassita dell’ossidazione. Miglioramento dell’attività e

specificità di antimalarici a bersaglio noto. Isolamento di nuovi potenziali principi attivi. Coinvolgimento della imprenditoria italiana e trasferimento di risultati.

Haemophilus influenzae in epoca post-vaccinale

La vaccinazione dell'infanzia con vaccini coniugati anti *Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib) ha prodotto un drastico decremento dell'incidenza di malattia invasive da Hib. Tuttavia, recentemente si è osservato un significativo incremento dell'incidenza da Hib in alcuni paesi Europei che hanno introdotto la vaccinazione da tempo. In Hib, il *locus* cap b contiene i geni responsabili della sintesi e dell'espressione del polisaccaride capsulare PRP. Accanto a fattori dell'ospite o correlati all'uso di vaccini meno immunogenici, l'amplificazione del *locus* capb sembra svolgere un ruolo nei fallimenti vaccinali. Nell'ambito della sorveglianza sulle malattie invasive da *H. influenzae*, il presente progetto si propone di monitorare i ceppi Hib da soggetti vaccinati e non e di individuare fattori di rischio per i fallimenti vaccinali. Nonostante l'introduzione della vaccinazione anti-Hib nell'infanzia, l'*H. influenzae* continua a rappresentare un serio problema nei soggetti adulti. In particolare, *H. influenzae* non tipizzabile (NTHi) è il batterio più frequentemente isolato dall'escreato di pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Nell'ambito del progetto sulla BPCO, che si propone di ottenere avanzamenti nella conoscenza dell'epidemiologia di questa malattia in Italia e dell'eziopatogenesi degli episodi di riacutizzazione, ci si attende di valutare il ruolo causale di NTHi nelle esacerbazioni acute.

Risultati attesi nel triennio

Valutare l'impatto dell'introduzione della vaccinazione anti-Hib sulla popolazione di ceppi Hib circolanti in Italia e evidenziare l'eventuale comparsa di nuovi cloni.

Individuare prontamente un'eventuale selezione, sotto pressione vaccinale, di ceppi Hib con copie multiple del *locus* capb.

Valutare il livello in anticorpi anti-PRP in soggetti con infezione invasiva da Hib precedentemente vaccinati.

Determinare la persistenza o l'acquisizione di singoli ceppi NTHi in pazienti con BPCO in corso di riacutizzazione, basandosi sulla tipizzazione genotipica degli isolati e sullo sviluppo di un titolo anticorpale ceppo-specifico.

Valutare se le riacutizzazioni siano associate con ceppi NTHi dotati di particolari caratteristiche (fattori di virulenza, antibiotico-resistenza).

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dai due progetti saranno trasferiti al Servizio Sanitario Nazionale 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 invasive da *Haemophilus influenzae*, le informazioni saranno trasferite in *workshop* e incontri periodici. Per lo studio sulle BPCO sarà utilizzato il sito web dell'Istituto Superiore di Sanità nonché il tramite delle società scientifiche che rappresentano le figure professionali coinvolte. 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.

I nuovi determinanti e le nuove popolazioni a rischio dell'epidemia da HIV in Italia

In questi ultimi anni si sono verificati numerosi cambiamenti nelle dinamiche dell'epidemia da HIV. I successi dei trattamenti farmacologici hanno contribuito a determinare la riduzione dell'incidenza di AIDS e a prolungare la sopravvivenza delle persone HIV positive che si

traduce in un numero sempre più elevato di persone infette viventi che potrebbe preludere a una riemersione dell'epidemia. Inoltre, l'evidente impatto della trasmissione per via sessuale, l'aumento delle persone che arrivano tardi alla diagnosi di AIDS, la quota sempre costante di eterosessuali che si contagiano attraverso rapporti con *partner* tossicodipendenti, sottolinea l'urgenza di conoscere le situazioni in cui giocano un ruolo fondamentale fattori individuali, strutturali e sociali che determinano la vulnerabilità delle persone al rischio di acquisire l'infezione.

Recentemente anche l'OMS ha ribadito la necessità di raccogliere informazioni sulle popolazioni a maggior rischio di infezione e di monitorarne la prevalenza. Questi dati, insieme con l'uso di marcatori surrogati dell'infezione da HIV (per es. le MST) e con l'effettuazione di studi sui comportamenti che sottendono la diffusione dell'HIV, può consentire di descrivere in modo dinamico i cambiamenti dell'epidemia da HIV.

Si propongono, quindi, studi mirati alle seguenti sottopopolazioni:

- tossicodipendenti
- HIV positivi da lunga data
- soggetti con una diagnosi tardiva di HIV
- soggetti mai testati per HIV
- soggetti con MST

Risultati attesi nel triennio

Comprendere le dinamiche attuali dell'epidemia da HIV attraverso la raccolta di informazioni sui gruppi di popolazione a maggior rischio. Questo sarà possibile:

- valutando la prevalenza dell'infezione da HIV tra i tossicodipendenti in trattamento presso i Servizi per le Tossicodipendenze e l'alcolismo e studiando comportamenti a rischio per l'infezione da HIV tra i tossicodipendenti che abusano di droghe per via endovenosa
- analizzando i comportamenti a rischio delle persone infette e studiando gli effetti della conoscenza dello stato di infezione sui comportamenti
- valutando i determinanti del ritardo di diagnosi di HIV tra i pazienti con AIDS
- studiando le persone che non hanno mai effettuato un *test* HIV perché non si percepiscono "a rischio", in quanto convinti di non essere mai stati esposti ad alcuna fonte di infezione
- analizzando le caratteristiche delle persone che hanno una MST oltre all'infezione da HIV

Trasferibilità dei risultati

Gli studi sulle nuove popolazioni a maggior rischio potranno essere utili per:

- monitorare la prevalenza dell'infezione da HIV in queste popolazioni
- costituire un utile indicatore per conoscere la diffusione dell'HIV tra la più ampia popolazione generale, in accordo con i sistemi di sorveglianza di seconda generazione proposti recentemente dall'OMS
- definire strategie di intervento e campagne informative per prevenire la diffusione dell'epidemia
- sviluppare modelli matematici per la stima degli HIV viventi
- fare previsioni sull'andamento futuro dell'epidemia da HIV in Italia

Identificazione di nuovi adiuvanti per la promozione di risposte protettive verso patogeni intracellulari: Tossina della Pertosse (PT) ricombinante, e suoi derivati

Al fine di individuare il sistema di adjuvanza che meglio è in grado di potenziare la protezione verso patogeni intracellulari e sfruttando il ruolo critico delle cellule dendritiche

(DC) nell'induzione di una efficace protezione, si intende individuare le combinazioni di adiuvanti mucosali e/o sistemici meglio in grado di polarizzare la risposta immune indotta dalla vaccinazione verso un profilo citochinico protettivo per patogeni intracellulari. Punto chiave è l'uso della Tossina della Pertosse geneticamente detossificata (dPT) e dei suoi derivati, in associazione o meno con altri adiuvanti, quali virosomi, timosina alfa-1 e il gene di attivazione linfocitaria-LAG3.

Abbiamo dimostrato come la dPT, componente essenziale dei vaccini contro la pertosse (Pizza et al, 1989), sia un potente adiuvante in grado di polarizzare in senso Th1 le funzioni delle DC umane (Ausiello et al, 2002). La dPT induce, infatti, maturazione delle DC, aumenta la loro funzione di presentazione dell'antigene e induce preferenzialmente citochine Th1, in sinergia con LPS per quanto riguarda la produzione di IL-12, citochina chiave nella polarizzazione Th1. Quindi la dPT rappresenta un adiuvante perfetto con forte attività protettiva soprattutto verso microrganismi intracellulari. La PT consiste di un oligomero A (S1) ad attività catalitica e un oligomero B, composto da 2 dimeri S2-S4 e S3-S4 associati alla subunità S5. L'attività adiuvante della PT è ascrivibile all'oligomero B. Recentemente è stato dimostrato come il dimero idrosolubile S3-S4 sia responsabile dell'attività mitogenica della PT (Latif et al, 2001) e del potenziamento della risposta CD8, sicuramente importante per l'infezione da microrganismi intracellulari.

Risultati attesi nel triennio

Si prevede di caratterizzare l'azione adiuvante della dPT in associazione o meno con gli altri adiuvanti su DC in modelli *ex vivo* umani e murini.

Tale risultato si otterrà misurando i parametri di attivazione delle DC indotti dall'esposizione agli adiuvanti in studio. In particolare sarà studiata l'espressione delle molecole co-stimolatorie, la capacità di indurre la proliferazione antigene-specifica di cellule T CD4+ e CD8+ e l'attivazione del sistema citochinico. Particolare attenzione sarà posta alle citochine dell'asse Th1 quali IL-12, IFN di tipo I e II, IL-23 e IL-27. Punto focale è l'individuazione di eventuali proprietà adiuvanti dei prodotti in studio nell'induzione di cellule T citotossiche. In dettaglio, intendiamo stabilire se l'oligomero B e il dimero S3-S4 siano in grado di riprodurre l'azione adiuvante della dPT. Inoltre si vuole investigare il legame della dPT e del dimero S3-S4 alle DC analizzando l'affinità per i diversi gangliosidi espressi nei *rafts*, individuando il recettore specifico, ad oggi ancora non conosciuto, nell'ambito della classe dei recettori che riconoscono i patogeni (TLRs).

Le preparazioni ottenute dalla dPT verranno studiate anche in associazione con LPS, (uno stimolo classico per le DC e in tracce presente nei vaccini), per individuare una eventuale azione sinergica sull'attivazione delle DC. Il sinergismo sarà studiato non solo attraverso la misurazione dei parametri di attivazione delle DC ma anche attraverso l'analisi del *signaling* intracellulare cercando di individuarne i *pathway* coinvolti.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà l'individuazione di nuove strategie di vaccinazione adatti per patogeni intracellulari che necessitano dell'induzione di risposte T protettive. Tali risposte sono scarsamente potenziate dagli adiuvanti attualmente in uso. Punto focale sarà l'individuazione della componente della dPT che meglio sia in grado di svolgere il compito di adjuvanza. 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. Tale progetto è in parte già inserito in un progetto europeo finanziato e in un progetto di collaborazione con l'industria in corso di finanziamento.

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 autoantigeni come marcatori diagnostici di patologie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da risposte immunitarie aberranti. Componenti *self* possono essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario per modificazioni post-traduzionali quali glicazione, ossidazione e aggregazione che avvengono nel corso dell'invecchiamento. Gli autoantigeni coinvolti nella patogenesi di tali malattie sono autoantigeni neuronali e autoantigeni endoteliali. Anticorpi anti-neurone sono stati dimostrati nel siero di pazienti con malattie neurodegenerative e potrebbero condurre allo sviluppo e progressione di esse in presenza di un'alterata permeabilità della barriera ematoencefalica. Gli

autoantigeni endoteliali vengono riconosciuti da anticorpi anti-cellule endoteliali che possono causare alterazioni della barriera ematoencefalica mediante attivazione o apoptosi delle cellule endoteliali. A tutt'oggi non sono ancora disponibili marcatori che permettano una diagnosi specifica per patologie neurodegenerative e che permettano di valutare il rischio, la progressione e gli effetti del trattamento farmacologico. Lo scopo del progetto è l'identificazione di autoantigeni riconosciuti dagli autoanticorpi presenti nel siero di pazienti con patologie neurodegenerative come la sindrome di Alzheimer e il morbo di Parkinson a diversi stadi di progressione. Verrà quindi valutato il possibile utilizzo degli autoanticorpi specifici come marcatori prognostici e/o diagnostici.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione mediante *screening* di librerie di espressione e analisi proteomiche di nuovi autoantigeni endoteliali o neuronali implicati nei meccanismi di neurodegenerazione.

Valutazione del possibile ruolo diagnostico degli autoanticorpi specifici per gli antigeni identificati e valutazione dell'associazione tra presenza di tali autoanticorpi nel siero dei pazienti e stadio della malattia.

Valutazione del ruolo patogenetico degli autoanticorpi specifici sulle cellule bersaglio (induzione di apoptosi, espressione di molecole di adesione, produzione di citochine pro-infiammatorie).

Trasferibilità dei risultati

Utilità come marcatori prognostici e/o diagnostici e per comprendere meglio i meccanismi eziopatogenetici di tali patologie

Identificazione e caratterizzazione di antigeni del sistema nervoso centrale in pazienti con disfunzione del sistema immunitario e manifestazioni psichiatriche

Diversi studi hanno dimostrato che la disfunzione del sistema immunitario, con conseguente formazione di reazioni autoimmuni e produzione di autoanticorpi, sia uno dei fattori eziopatogenetici in alcune manifestazioni psichiatriche tra cui schizofrenia e autismo. In particolare nel siero di pazienti con schizofrenia è stata dimostrata la presenza di anticorpi specifici per neurotrasmettitori, tra cui la serotonina, e per diversi recettori di neurotrasmettitori, tra cui i recettori muscarinici M1 e M2.

A causa dell'eterogeneità delle manifestazioni psichiatriche risulta importante lo studio dei meccanismi patogenetici coinvolti in queste patologie per una diagnosi accurata e una terapia adatta.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di marcatori immunologici per il miglioramento della diagnosi e per la comprensione dei meccanismi immunopatogenetici che sono alla base delle malattie psichiatriche.

In particolare mediante la tecnica del DNA ricombinante verranno identificati nuovi antigeni del sistema nervoso centrale associati alla schizofrenia e all'autismo.

Trasferibilità dei risultati

L'individuazione di autoantigeni riconosciuti da autoanticorpi specifici di pazienti con determinate malattie psichiatriche 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.

Identificazione simultanea di patogeni trasmessi da zecche mediante tecniche molecolari

Le patologie trasmesse dalle zecche sono considerate una emergenza sanitaria a livello globale. Le zecche ospitano un elevato numero di specie di batteri, virus e protozoi, e una parte di queste ha importanza in campo umano in quanto causa di patologie come la borreliosi di *Lyme*, l'*erlichiosi granulocitica*, la febbre bottonosa del Mediterraneo, l'encefalite virale, la malattia da graffio del gatto, la tularemia, la febbre Q e la babesiosi. Il riconoscimento specifico dei patogeni umani nelle zecche rappresenta un importante elemento di conoscenza, che può essere utilizzato per valutare il rischio di trasmissione. Le tecnologie molecolari consentono la messa in evidenza e la individuazione dei diversi patogeni presenti nel vettore in maniera affidabile. La maggior parte dei metodi disponibili si basa sull'amplificazione *in vitro* di specifici frammenti di DNA e sulla caratterizzazione attraverso il sequenziamento. Tali metodi possono essere migliorati sia variando gli specifici bersagli molecolari sia includendo nel *test* patogeni umani di recente descrizione, e soprattutto utilizzando saggi che consentano l'identificazione simultanea dei diversi patogeni di importanza sanitaria.

Risultati attesi nel triennio

L'attività proposta si incentra sullo sviluppo di un saggio per l'identificazione simultanea di patogeni presenti nelle zecche e da queste potenzialmente trasmissibili all'uomo. Il saggio è basato sull'ibridazione di specifici prodotti di amplificazione ad una serie di oligonucleotidi covalentemente legati ad un supporto (*Reverse Line Blot Hybridization*, RLB). La specificità del sistema, che è funzione della unicità della sequenza degli oligonucleotidi e della stringenza delle condizioni di ibridazione, è molto elevata e permette di identificare i diversi patogeni a livello di specie, genotipo e sottotipo.

L'obiettivo è di includere nel *test* RLB oligonucleotidi specifici che consentano di identificare:

- i principali patogeni umani trasmessi dalle zecche;
- la specie di appartenenza della zecca
- e l'ospite vertebrato su cui la zecca ha effettuato il pasto di sangue.

La specificità del *test* verrà valutata sugli acidi nucleici preparati da culture *in vitro* o da ceppi di riferimento di batteri e protozoi e da un campione di zecche (generi *Ixodes*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*) raccolte in collaborazione con ricercatori dell'ISS afferenti ad altri reparti.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà a informare il personale del 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.

La disponibilità di un saggio come il *Reverse Line Blot Hybridization*, relativamente semplice dal punto di vista tecnologico, potrà incontrare l'interesse di società operanti nel settore diagnostico umano.

Immobilised glycans for testing of anti-carbohydrate IgE

Il progetto è stato proposto da un gruppo di ricerca appartenente a una struttura universitaria austriaca (*Universitaet fuer Bodenkultur* di Vienna); il dichiarante si propone di svilupparne una parte in qualità di collaboratore del proponente.

Il progetto si propone di sviluppare un macrosupporto con un esteso pannello di oligosaccaridi sintetici aventi una struttura presente in molte componenti allergeniche di origine vegetale, tra cui particolarmente quelle derivanti da polline di *Cupressaceae*, che hanno

rappresentato l'oggetto di numerose ricerche nel nostro reparto, già da diversi anni. I risultati di tali ricerche, pubblicati su riviste internazionali e riportati in diversi congressi nazionali e internazionali, hanno evidenziato che un numero consistente di soggetti allergici al veleno di imenotteri, dei soggetti allergici al polline di Cipresso (fino a circa il 70%), ma se pure in misura minore anche degli allergici con altre pollinosi (*oleaceae*, *graminaceae*, *compositae* ecc.), di soggetti con alcune allergie alimentari ad alimenti vegetali (pomodoro, carota, sedano, kiwi), possiede anticorpi di classe IgE nel siero, in grado di riconoscere epitopi di natura carboidratica.

I macrosupporti definiti “*glycan array*”, verranno utilizzati per effettuare saggi immunoenzimatici allo scopo di identificare nel siero di soggetti allergici e in quello di topi utilizzati come modelli di sensibilizzazione allergica, anticorpi di classe IgE specifici.

Risultati attesi nel triennio

Ci si aspetta di ottenere macrosupporti rappresentati da piastre da microtitolazione, a cui sono stati legati covalentemente oligosaccaridi sintetici con differenti strutture, corrispondenti a quelle identificate su componenti allergeniche, in grado di legare in modo specifico e sensibile anticorpi IgE presenti nel siero di pazienti allergici e in quello di topi opportunamente immunizzati allo scopo di produrre anticorpi di classe IgE specifici per tali strutture oligosaccaridiche. In particolare ottenendo anticorpi IgE standard da utilizzare in successivi test di *screening*.

Trasferibilità dei risultati

Completamento e/o miglioramento della diagnosi *in vitro* delle patologie allergiche IgE mediate, con particolare riferimento alla identificazione di false cross-sensibilizzazioni causate dalla presenza nel siero di anticorpi IgE crossreattivi solo per epitopi carboidratici. Possibilità di disporre di Modelli animali standardizzati, per la valutazione di protocolli terapeutici.

Immunità sierologica per *Corynebacterium diphtheriae*

L'argomento di studio costituisce un *workpackage* del progetto europeo “*European diphtheria surveillance network*”. Lo scopo generale del progetto è quello di stabilire un *network* che includa paesi della comunità economica europea, paesi associati e EEA/EFTA in quanto questi ultimi, negli anni 1990-2000 hanno visto l'espandersi di un'epidemia di difterite senza precedenti in epoca post vaccinale. Gli obiettivi sono quelli di armonizzare, standardizzare e incrementare la sorveglianza per *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*, per determinare la prevalenza e le caratteristiche dei ceppi circolanti nei vari paesi, creare un *database* per permettere il rapido monitoraggio dei ceppi/cloni isolati, sviluppare un sistema integrato di metodiche molecolari a fini epidemiologici per comprendere e sorvegliare il diffondersi dei cloni epidemici. Inoltre ci si prefigge di determinare la prevalenza della malattia dovute non solo a ceppi tossinogenici (difterite classica) ma anche a ceppi non tossinogenici (faringiti, endocardite, artrite settica, ecc). La protezione dalla difterite classica è conferita dagli anticorpi anti tossina, i quali non hanno un ruolo nel prevenire le infezioni da non tossinogenici. È quindi necessario disporre non solo di metodi validi per la determinazione degli anticorpi anti tossina difterica, ma poter determinare anche anticorpi verso altri antigeni di *C. diphtheriae* che potrebbero avere un ruolo nelle infezioni da ceppi non tossinogenici.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito di tale progetto è quindi previsto che sieri raccolti in almeno tre paesi europei (Italia, UK, Finlandia), tre paesi associatisi recentemente (Latvia, Lithuania, Czech Republic) e Russia vengano saggiati per determinare i livelli anticorpali anti tossina difterica e gli anticorpi anti *C. diphtheriae*. I risultati attesi dovrebbero confermare l'ipotesi che in paesi con copertura

vaccinale pari a circa il 90% in età pediatrica, circolazione scarsissima di *C. diphtheriae* i profili sieroepidemiologici per anticorpi anti tossina difterica e anti *C.diphtheriae* siano diversi da quelli rilevabili in paesi quali Latvia e Russia nei quali si è verificata l'epidemia di difterite. Poiché la vaccinazione antidifterica è basata sulla induzione di anticorpi anti tossina difterica, l'eventuale produzione di anticorpi verso altri antigeni del batterio dipende dal grado di purezza del tossoide usato per formulare il vaccino. Nei paesi europei ad alta copertura vaccinale si prevede quindi di trovare livelli anticorpali molto bassi, se non assenti per antigeni somatici di *C. diphtheriae* e ciò potrebbe essere una delle cause per il verificarsi di infezioni da ceppi non tossinogenici.

Trasferibilità dei risultati

Il quadro sieroepidemiologico che verrà ricavato servirà a conoscere meglio l'epidemiologia delle infezioni da ceppi non tossinogenici.

La messa a punto di un metodo per la determinazione di anticorpi anti *C.diphtheriae* potrebbe essere usato a scopo di studio per valutare la produzione di anticorpi anti batterio stimolati da vaccinazione in un modello animale per confrontare tra di loro vaccini anti difterite in uso in Italia e in altri paesi associatisi di recente alla UE.

Immunizzazione mucosale con antigeni di HIV basati su proteine e peptidi virali fusi ad un nuovo adiuvante mucosale peptidico

Un vaccino ideale contro HIV dovrebbe stimolare una risposta immunitaria sia a livello mucosale che sistemico. L'immunizzazione per via mucosale ha il vantaggio di indurre una risposta anticorpale sia locale che sistemica (IgA nelle mucose e IgG nel siero), sia una risposta cellulo-mediata di tipo *helper* (CD4+) e citotossico (CD8+). Lo scopo del nostro progetto è quello di studiare la fattibilità di vaccini mucosali contro HIV utilizzando nuovi adiuvanti identificati nel nostro laboratorio e recentemente brevettati. Antigeni di HIV (Tat, gp120, gag, ecc.), sia individualmente che in *cocktail*, saranno somministrati per via mucosale in combinazione con un nuovo adiuvante peptidico. La valutazione della risposta immunitaria specifica comprenderà l'analisi di risposte umorali sistemiche e mucosali e di risposte cellulo-mediate, sia di tipo CD4+ che CD8+. Nella seconda parte del progetto l'adiuvante sarà sintetizzato insieme agli antigeni, o a sequenze da essi derivate, in un unico peptide e i costrutti saranno somministrati per via mucosale. Saranno saggiate diverse vie di immunizzazione mucosale, tra cui quelle rilevanti per l'infezione da HIV.

Risultati attesi nel triennio

L'approccio descritto è innovativo nel campo dei vaccini contro HIV, in quanto finora non sono disponibili adiuvanti mucosali in forma peptidica. I risultati di tale studio daranno delle informazioni utili sulla fattibilità di vaccini mucosali sintetici con altri antigeni di HIV. Questo studio fornirà inoltre le basi per la successiva valutazione pre-clinica di vaccini mucosali contro HIV da effettuare nei primati.

Trasferibilità dei risultati

L'approccio seguito in questo studio sarà utile non solo per il disegno di vaccini mucosali contro HIV, ma anche per la formulazione di vaccini sintetici preventivi o terapeutici contro altri patogeni e contro patologie di diversa natura.

Impiego di molecole parassitarie nella immunoregolazione di malattie autoimmuni

I parassiti elminti e intestinali causano infezioni croniche di tipo Th2. La presenza di infezioni elmintiche è associata ad una bassa presenza di malattie autoimmuni (Th1) e parassiti

e sostanze derivate sono efficaci per la cura di malattie autoimmuni. La somministrazione di larve di *Trichuris suis*, parassita del suino le cui forme larvali colonizzano la mucosa intestinale umana senza svilupparsi, induce un miglioramento delle condizioni cliniche di pazienti con morbo di Crohn. Molecole di *Echinococcus granulosus*, interagiscono direttamente con il sistema immunitario umano a livello dei neutrofili, delle cellule dendritiche e dei linfociti T e B, stimolando una risposta Th2 e IgE e IgG4. Prodotti metabolico/catabolici delle larve di quarto stadio (L4ES) di *Ostertagia ostertagi*, un parassita gastrointestinale dei bovini hanno effetto immunomodulante: inibiscono *in vitro* la proliferazione dei leucociti ematici di bovini e la produzione di IFN-gamma e inibiscono la proliferazione di linfociti splenici murini. Il presente progetto prevede: 1. identificazione di nuove molecole parassitarie e la valutazione *in vitro* del loro effetto su cellule immunitarie murine e umane; 2. utilizzo di molecole immunomodulanti di *E. granulosus* e di prodotti metabolico/catabolici di *O.ostertagi* L4ES per modulare *in vivo* la patologia associata a infiammazione del tratto gastrointestinale in un modello murino di colite indotta da TNBS.

Risultati attesi nel triennio

Tali studi potrebbero rappresentare un approccio iniziale per valutare se tali molecole possano essere utilizzate per modulare la patologia associata ad infiammazione del tratto gastrointestinale nel topo.

Trasferibilità dei risultati

Industrie farmaceutiche

Individuazione e caratterizzazione di allergeni presenti negli alimenti responsabili di reazioni allergiche IgE-mediate: messa a punto di metodiche per la valutazione del potenziale allergenico degli alimenti

La stima della prevalenza delle allergie alimentari nella popolazione adulta è di circa il 2%, valore che sale a circa il 10% nei bambini. La diagnosi delle allergie da alimenti si basa sia sull'anamnesi del paziente, sia sui *test* diagnostici specifici *in vivo* e *in vitro*. A tal fine sono disponibili in commercio molti estratti allergenici da alimenti, che tuttavia non sono ben caratterizzati. Il miglioramento della diagnosi delle patologie allergiche da alimenti potrà essere ottenuto solo attraverso la completa identificazione e caratterizzazione delle molecole presenti negli alimenti e responsabili delle patologie allergiche. Per una corretta analisi delle proprietà allergeniche di un alimento e per lo studio dei meccanismi che regolano la sensibilizzazione verso un allergene alimentare, sarà necessario disporre quindi sia di metodiche standardizzate per la caratterizzazione biochimica e immunochimica dell'estratto, che di modelli animali per l'induzione *in vivo* di una sensibilizzazione allergica *ex novo*. La ricerca si propone quindi i seguenti obiettivi: 1) messa a punto di metodiche per la preparazione e caratterizzazione biochimica di estratti ottenuti da alimenti; 2) caratterizzazione immunochimica degli estratti attraverso l'impiego di sieri di soggetti allergici; 3) messa a punto e caratterizzazione di un modello murino di sensibilizzazione allergica da impiegare per la valutazione del potenziale allergenico di diversi alimenti; 4) impiego del modello murino di sensibilizzazione allergica per lo studio dei meccanismi immunologici, ancora non del tutto chiariti, coinvolti nelle patologie allergiche.

Risultati attesi nel triennio

1)Messa a punto delle metodiche per la preparazione di estratti da alimenti.
2)Caratterizzazione biochimica e immunochimica. 3) Studio della risposta *in vivo* del modello animale.

Trasferibilità dei risultati

Servizio Sanitario Nazionale per la sicurezza d'uso degli alimenti

Induzione di CTLA-4 su linfociti T e modulazione della risposta immunitaria

Il ruolo del cAMP come secondo messaggero nelle cellule del sistema immunitario è stato ampiamente descritto. In particolare, aumenti di cAMP intracellulare nei linfociti T determinano effetti inibitori sulla proliferazione cellulare e sulla produzione di IL-2. 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. Esso è coinvolto nella regolazione della tolleranza periferica. Le molecole CTLA-4 sono costitutivamente espresse su linfociti T regolatori (Treg), i quali presentano un fenotipo anergico in quanto 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. Alcuni nostri studi preliminari hanno evidenziato che linfociti T CD4+ coltivati in presenza di CT hanno funzioni soppressive. L'obiettivo di questo studio è quello di analizzare le funzioni regolatorie delle cellule generate in presenza di induttori di cAMP in termini di soppressione della proliferazione e della produzione di citochine dei linfociti T indotta da stimoli policlonali o antigene-specifici *in vitro* e in modelli sperimentali.

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. In base ai risultati ottenuti sarà possibile identificare i meccanismi cellulari e molecolari attraverso i quali i linfociti T CD4+ trattati con analoghi o induttori di cAMP esercitano funzioni soppressive *in vitro*. Inoltre, l'utilizzo di modelli sperimentali murini ci permetterà di analizzare la capacità dei linfociti T trattati con analoghi o induttori di cAMP di modulare la risposta immunitaria *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, sono 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.

Infezioni croniche e mimetismo molecolare implicati nei processi autoimmuni dell'aterosclerosi: nuove strategie terapeutiche

Il mimetismo molecolare tra agenti infettivi e molecole dell'ospite potrebbe essere responsabile dei fenomeni autoimmuni che contribuiscono al processo aterosclerotico. In particolare, è stata dimostrata la presenza all'interno delle placche aterosclerotiche di *Chlamydia pneumoniae* (CP) e questo suggerisce il coinvolgimento di potenziali *target* microbici nell'attivazione dei linfociti infiltranti la placca. Tra i meccanismi autoimmuni legati all'aterosclerosi abbiamo recentemente dimostrato (Microb Infection, 2005) il perdurare di una risposta Th1 azionata specificamente dalle cellule dendritiche (DC) maturate in presenza di CP. La beta2-Glicoproteina I (beta2-GPI), proteina plasmatica, presenta omologie con diversi microorganismi e è responsabile di risposte autoimmuni in corso di aterosclerosi. Il gruppo della d.ssa Riganò ha recentemente dimostrato chela forma ossidata della beta2-GPI, è in grado di conferire alle DC umane la capacità di promuovere un *priming* di tipo Th1 (Blood, 2005). Dal

momento che il mimetismo molecolare tra antigeni di agenti infettivi e molecole dell'ospite può coinvolgere non solo sequenze aminoacidiche lineari della molecola ma anche strutture conformazionali, è possibile che l'ossidazione determini nella beta2-GPI l'esposizione di epitopi criptici o neoepitopi o la formazione di epitopi conformazionali che presentano una sequenza aminoacidica condivisa con strutture microbiche comuni che rappresentano i ligandi naturali dei TLR.

Risultati attesi nel triennio

Identificare i recettori delle DC coinvolti nell'infezione/interazione con CP 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 CP e/o da bersagli antigenici (proteine purificate) derivati dal batterio.

Identificazione del TLR coinvolto nella attivazione delle DC indotta dalla beta2-GPI e dai prodotti di ossidazione della proteina (gruppo Riganò).

Valutazione, in pazienti con aterosclerosi, della risposta immune cellulare verso la beta2-GPI e verso strutture batteriche che presentano sequenze aminoacidiche condivise con la beta2-GPI,

Individuazione di antigeni bersaglio della risposta CMI specificamente e differenzialmente espressi durante il *carriage* asintomatico nonché nelle varie fasi della patologia cardiovascolare (acuta-persistente) e durante gli interventi terapeutici.

Caratterizzazione delle modificazioni del *pattern* citochinico collegate all'insorgenza e all'evoluzione della patologia cardiovascolare.

Individuazione di strategie di immunomodulazione *in vitro* delle DC per ottenere la tolleranza specifica alla b2-GPI e/o lo spegnimento della cronicizzazione di una risposta Th1 pro-infiammatoria.

Trasferibilità dei risultati

L'obiettivo conclusivo è quello di validare (o rigettare), con approcci di medicina sperimentale e clinica, le presunte associazioni fra alcune patologie cardiovascolari 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. Quindi lo studio si articolerà sulla base del raggiungimento il seguente obiettivo primario:

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 e internazionali, sono gli indicatori che si intende raggiungere.

Infezioni da streptococco di gruppo A e disordini neuro-comportamentali nel bambino

Con il termine "disordini ossessivo-compulsivi" (DOC) sono indicati un gruppo di disturbi a insorgenza precoce (generalmente in età pediatrica o adolescenziale). Si distinguono due sottotipi di DOC: un primo tipo riscontrato negli adolescenti, con sintomi uguali a quelli riscontrabili in età adulta, e un secondo tipo a insorgenza precoce (ca. 5 anni), spesso associato a sintomatologia ticcosa, particolarmente alla Sindrome di Tourette. Un ulteriore sottogruppo, caratterizzato da una brusca insorgenza e da un decorso fluttuante, è stato recentemente identificato con l'acronimo PANDAS (*Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders associated with Streptococcal infections*). L'esarcebazione dei sintomi, in genere correlata ad infezione streptococcica, ha fatto ipotizzare un'alterata risposta immune agli antigeni

streptococchi in pazienti con uno specifico *background* genetico, come già dimostrato per la Corea di Sidenham.

Risultati attesi nel triennio

Pazienti con sintomatologia DOC verranno analizzati per una serie di caratteristiche volte a valutare il ruolo delle infezioni da *S.pyogenes* (GAS) sull'insorgenza della sintomatologia DOC in bambini in età pre-adolescenziale, sia in presenza che in assenza di TIC.

Tale valutazione sarà effettuata sulla base di numerosi parametri e *test* quali esami psichiatrici, fisici, neuromotori, tests neurofisiologici, ecc. Sarà effettuata la titolazione sierica degli anticorpi streptococchi (titolo anti-streptolisinico, TAS), e tamponi faringei verranno analizzati per la presenza di GAS. Sui ceppi isolati si procederà all'identificazione e tipizzazione sierologica (*T pattern*, OF) e molecolare (*emm typing*). Verrà valutata l'antibiotico resistenza fenotipica ai macrolidi e alla tetraciclina e la presenza di geni *erm* e *mef*. Verrà inoltre studiata l'adesività e l'invasività batterica in cellule epiteliali immortalizzate, mediante il saggio di "*antibiotic-protection*". Mediante PCR verrà valutata la presenza di geni codificanti varie tossine streptococciche (*speA*, *speC*, *speF* etc.).

Tali caratteristiche saranno poste a confronto con quelle di ceppi isolati da patologie diverse. Verranno inoltre esaminati, e possibilmente identificati, gli antigeni streptococchi in grado di *cross-reagire* con antigeni cerebrali umani, mediante elettroforesi mono e bi-dimensionale di estratti di cervello e immunoblot utilizzando sieri di pazienti con DOC in confronto a sieri normali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio saranno trasferiti alla comunità scientifica mediante pubblicazioni su riviste del settore. I dati ottenuti fornirebbero la base per la compilazione di linee guida per il trattamento/prevenzione di questi disturbi, oltre alla possibilità di individuare antigeni potenzialmente pericolosi nella formulazione di futuri vaccini.

Infezioni gastroenteriche: sorveglianza, diagnosi ed epidemiologia molecolare degli agenti batterici maggiormente diffusi in Italia

Negli ultimi anni, si è assistito a importanti cambiamenti nello scenario delle infezioni sostenute da batteri enteropatogeni con la comparsa di nuovi agenti, nuovi veicoli di infezione e nuove situazioni epidemiologiche.

La diffusione di cloni all'interno di specie batteriche ad elevata diffusione rende difficile l'identificazione delle sorgenti, dei veicoli e delle vie di trasmissione dell'infezione e impone l'introduzione di metodiche innovative in grado di potenziare i sistemi di sorveglianza a livello nazionale e internazionale.

L'uso di metodi molecolari di tipizzazione consentono oggi di identificare episodi epidemici diffusi in aree geografiche estese, di stabilire relazioni tra casi di malattia apparentemente sporadici, di riconoscere il veicolo di infezione e risalire ai serbatoi dei diversi agenti eziologici.

L'ottimizzazione del potere di rivelazione di episodi epidemici sia a livello nazionale che internazionale, il controllo ottimale delle sorgenti di infezione in comunità e la produzione di linee guida e procedure operative *standard* per il controllo della diffusione di cloni particolarmente frequenti e virulenti rappresentano quindi i principali aspetti di sanità pubblica inerenti a questa proposta di ricerca.

Risultati attesi nel triennio

Costituzione di un sistema di elevata qualità delle indagini microbiologiche che sono alla base dei sistemi di sorveglianza delle malattie infettive nel nostro Paese, con opportune integrazioni a livello internazionale.

Coordinamento di tutte le attività di ricerca e di sorveglianza sulle infezioni da *Salmonella* e da *Campylobacter*, e altri patogeni enterici ad elevata diffusione nel nostro Paese.

Descrizione delle caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei cloni batterici maggiormente associati alle infezioni umane

Analisi molecolare dei profili di resistenza multipla agli antibiotici

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento delle metodiche per la sub-tipizzazione degli stipti isolati a una rete di laboratori periferici.

Confronto tra le caratteristiche dei ceppi isolati dall'uomo con quelle di ceppi isolati da animali e alimenti presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Infezioni invasive da *Streptococcus pyogenes* in Europa

Alla luce di recenti pubblicazioni scientifiche che hanno evidenziato come, a partire dagli anni '90, si siano verificati cambiamenti importanti nella epidemiologia delle manifestazioni cliniche delle infezioni gravi di *S. pyogenes* (fascite necrotizzante e *shock* tossico) e, in considerazione dell'esistenza di insufficienti attività di sorveglianza condotte a livello nazionale dai paesi europei, dal Settembre 2002 è stato istituito un *network* unificato di sorveglianza europeo (dall'acronimo STREP-EURO) approvato e finanziato dal Quinto Programma Quadro (www.strep-euro.lu.se).

Il Reparto di Malattie Respiratorie e Sistemiche del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate e "WHO Collaborating Centre on Streptococci and Streptococcal Infections" costituisce il rappresentante italiano del progetto e si è attivato nella raccolta dei ceppi e dei dati clinici utilizzando un questionario concertato e approvato dai paesi partecipanti contenenti informazioni sul paziente, manifestazioni cliniche, fattori di rischio, esito della malattia. Tale questionario è disponibile sul sito del Dipartimento.

Il nostro Reparto ha esteso il programma di sorveglianza nazionale alle infezioni gravi causate da tutti gli streptococchi beta emolitici ed è impegnato nella conferma della identificazione dei ceppi all'arrivo, della loro tipizzazione e della determinazione del *pattern* di resistenza agli antibiotici attraverso metodi convenzionali e molecolari.

Risultati attesi nel triennio

La raccolta dei ceppi è stata stabilita in due anni (2003-2005), ma il nostro gruppo intende mantenere attiva la sorveglianza per il prossimo triennio 2006-2008, in considerazione dell'importanza di poter avere un quadro in tempo reale sul cambiamento delle caratteristiche di virulenza dei ceppi circolanti e del vantaggio di poter usufruire di una rete di sorveglianza già attivata.

L'immissione, da parte di ogni Paese partecipante, dei dati epidemiologici, clinici e microbiologici in un *database* dedicato permetterà il confronto delle varie realtà nazionali riguardo l'incidenza delle infezioni gravi da *S. pyogenes*, le principali manifestazioni cliniche, le caratteristiche di virulenza e la diffusione della resistenza agli antibiotici.

L'estensione del programma di sorveglianza nazionale a tutti gli streptococchi beta-emolitici permetterà una ulteriore panoramica sull'incidenza e le caratteristiche cliniche e microbiologiche di altre malattie gravi da streptococco quali le infezioni neonatali da Streptococco di gruppo B di cui sono disponibili solo dati a livello regionale.

Trasferibilità dei risultati

Considerato l'alto numero di tipi M circolanti e il largo spettro di manifestazioni cliniche associate alla malattia invasiva da *S. pyogenes*, l'esame dei dati raccolti in un unico *database* è essenziale per ottenere una significatività statistica all'identificazione di particolari associazioni, quali ad esempio tra marcatori di virulenza, patogenicità e mortalità. I risultati di Strep-Euro

miglioreranno la comprensione sull'epidemiologia delle infezioni invasive da *S. pyogenes* in Europa, con diretto impatto sul management della salute pubblica come la stesura di linee guida e informazioni utili per un possibile vaccino polivalente, da tempo oggetto di studio e ricerca.

Influenza aviaria e rischio di pandemia nell'uomo

I virus influenzali aviari ad alta patogenicità (HPAI) appartenenti ai sottotipi H5 e H7, oltre a provocare devastanti epizootie in alcune specie aviarie domestiche di particolare interesse zootecnico, sono anche in grado, in opportune condizioni ambientali, di infettare l'uomo, causando gravi e spesso fatali infezioni respiratorie. L'eventuale acquisizione della capacità di trasmissione interumana permetterebbe al virus di scatenare una pandemia influenzale.

La complessità e la dimensione globale del problema richiedono risorse aggiuntive nel campo della ricerca, attraverso programmi svolti in un contesto internazionale di cooperazione tra settore di medicina umana e medicina veterinaria. Il presente progetto, a cui parteciperanno diversi Paesi europei, avrà i seguenti obiettivi:

comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della trasmissione interspecie dei virus influenzali, con particolare riferimento ai fenomeni di adattamento alla nuova specie e ai meccanismi di interazione e co-evoluzione virus-ospite.

conoscere i fattori di rischio ambientale che favoriscono la trasmissione di virus dalle specie selvatiche a quelle domestiche, anche in relazione ai flussi migratori, all'interno di paesi europei.

attivare, in linea con i programmi del CDC europeo, sistemi di sorveglianza del personale esposto al rischio di infezione nel corso di epizootie influenzali in allevamenti avicoli, anche attraverso studi siero-epidemiologici.

Risultati attesi nel triennio

Lo svolgimento del programma permetterà di individuare i circuiti di trasmissione interspecie dei virus influenzali, con particolare riferimento a quelli appartenenti ai sottotipi antigenici H5 e H7 che si sono dimostrati capaci di compiere il salto di specie, passando dagli uccelli selvatici migratori alle specie aviarie domestiche e poi anche all'uomo.

Nell'ambito del progetto saranno ulteriormente standardizzate e validate metodiche sierologiche in grado di identificare con sufficiente grado di sensibilità e specificità la presenza nei sieri umani di anticorpi verso le emagglutinine aviarie.

La stretta collaborazione tra gruppi nazionali e europei che operano in campo veterinario e umano per il controllo di questa patologia, creerà le sinergie necessarie per una più coordinata e efficace risposta ad un'eventuale emergenza pandemica sia a livello nazionale che internazionale.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti saranno resi disponibili attraverso pubblicazioni scientifiche e utilizzati per l'elaborazione di linee guida e documenti ufficiali in ambito nazionale e internazionale.

I dati scaturiti dalle ricerche saranno condivisi con le strutture veterinarie responsabili a livello nazionale ed europeo, nonché messi a disposizione del Centro per il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute.

Le metodiche sviluppate saranno trasferite alle strutture coinvolte attraverso attività di *training* e formazione tecnico/scientifica degli operatori sanitari, sia del settore veterinario che di quello di medicina umana.

Interazione HIV-patogeni opportunisti: aspetti favorenti e/o inibitori la replicazione virale nelle APC e conseguenze funzionali nella risposta adattativa

L'insorgenza di malattie opportunistiche in corso di AIDS indica che a causa dell'infezione con HIV vengono alterate le funzioni dell'immunità naturale e dei linfociti T responsabili dell'immunità cellulo-mediata. L'HIV infetta sia le APC che i linfociti T CD4+. Quindi durante la presentazione dell'antigene potrebbe avvenire sia l'attivazione che la trasmissione del virus ai linfociti T, infezione che contribuisce in maniera decisiva alla deplezione linfocitaria che caratterizza i pazienti con AIDS e che rappresenta il fattore eziopatogenetico principale dell'immunodeficienza secondaria. Di conseguenza, se le APC sono fonte principale d'infezione, i linfociti specifici per patogeni opportunisti sono quelli che hanno maggiori probabilità di infettarsi e quindi poi andare incontro a morte cellulare. Inoltre, esiste la possibilità che le stesse APC possano essere coinfezionate da HIV e da patogeni opportunisti. La conseguenza funzionale della coinfezione non è chiara dai dati della letteratura, che sono peraltro contrastanti e certamente non riguardano i patogeni opportunisti più diffusi come *C. albicans* e *M. avium*. Di conseguenza obiettivo principale di questo progetto è verificare se la confezione della APC con HIV e diversi patogeni possa avere effetti "inibitori" e/o "favorenti" l'infezione da HIV delle APC stesse o della loro capacità di trasmettere il virus a linfociti T.

Risultati attesi nel triennio

I risultati del primo anno di attività permetteranno di identificare le modificazioni fenotipiche delle APC infettate con patogeni opportunisti quali *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *M. tuberculosis*/BCG, *M. avium complex*. I risultati indicheranno quale/i patogeno, tra quelli utilizzati, sia in grado di modulare l'espressione dei recettori di membrana coinvolti nell'infezione delle APC con HIV. Inoltre i dati relativi alla produzione di citochine e chemochine indicheranno tra i patogeni utilizzati quali possano contribuire alla generazione di un *milieu* stimolatorio o inibitorio la replicazione di HIV nelle APC. Nel loro insieme questi dati forniranno indicazioni necessarie per la selezione dei patogeni da utilizzare per gli studi successivi e inoltre forniranno gli strumenti per la definizione di modello patogenetico dell'infezione da HIV.

I dati ottenuti consentiranno anche l'identificazione dei componenti strutturali/secreti dai microorganismi che siano responsabili delle alterazioni fenotipiche e funzionali osservate sulle APC.

Trasferibilità dei risultati

Il raggiungimento degli obiettivi di questo progetto consentirà 1) un approfondimento delle conoscenze sul ruolo delle cellule presentanti nelle infezioni da HIV e in generale sui meccanismi di *killing*, processamento e presentazione di antigeni dei patogeni opportunisti, 2) un approfondimento delle conoscenze nella definizione del ruolo del contatto ripetuto con i patogeni nella deplezione di linfociti T CD4+ che si osserva in pazienti HIV infetti, 3) l'identificazione di molecole dei patogeni coinvolte nei fenomeni di interferenza con il fenotipo e la funzione delle APC, 4) l'allestimento di un modello sperimentale *ex vivo* utile anche per la messa a punto di strategie innovative mirate a contrastare l'infezione da HIV stessa. Le molecole identificate o inibitori della loro funzione, infatti, potranno essere oggetto di brevetti e d'innovazione dell'industria biomedica.

Italian seroconversion study

Lo Studio di Coorte Multicentrico, definito anche "*Italian Seroconversion Study*", è uno studio longitudinale iniziato nel 1987 e finanziato nell'ambito del Programma Nazionale Ricerca AIDS. Sono state arruolate sino ad ora oltre 2000 persone sieropositive per HIV, per le quali è stato possibile definire con una buona accuratezza la data di sieroconversione. Il

principale criterio di inclusione nella coorte è infatti rappresentato dalla disponibilità di un *test* sierologico negativo seguito da un *test* positivo entro un periodo massimo di due anni (la data di sieroconversione viene quindi stimata come il punto di mezzo fra l'ultimo *test* negativo e il primo *test* positivo). Il *follow-up* delle persone arruolate permette di descrivere la storia naturale e il decorso clinico dell'infezione da HIV, nonché l'effetto di popolazione delle terapie. L'*Italian Seroconversion Study* è attualmente inserito all'interno di *CASCADE Concerte Action on SeroConversion to AIDS and Death in Europe*), uno studio multicentrico europeo, finanziato nell'ambito del *6th Framework on Research, Technological Development and Demonstration* dell'Unione Europea. La coorte italiana partecipa anche a *CASCADE Virology*, un sottoprogetto che si propone di valutare l'andamento temporale di sottotipi virali e resistenze ai farmaci antiretrovirali in coorti di sieroconvertiti appartenenti al progetto Europeo *CASCADE*.

Risultati attesi nel triennio

All'epoca del concepimento del progetto, nel 1987, l'Italia era uno dei pochi paesi in cui la maggior parte delle persone con infezione da HIV erano tossicodipendenti. L'obiettivo principale, pertanto, era quello di valutare la storia naturale dell'infezione da HIV (all'epoca non erano ancora disponibili farmaci antiretrovirali) nei tossicodipendenti, nonché identificare indicatori e determinanti di progressione clinica e/o di immunodepressione. Col passare del tempo, iniziarono ad essere arruolati anche omosessuali e contatti eterosessuali, in modo da rappresentare gruppi di controllo per i tossicodipendenti. Infine, l'introduzione di terapie antivirali sempre più potenti modificò gli obiettivi principali dello studio. Attualmente, l'*Italian Seroconversion Study* permette di valutare il cosiddetto "effetto di popolazione" delle terapie antiretrovirali, consentendo di verificare l'allungamento del tempo di incubazione dell'AIDS e della sopravvivenza globale confrontando anni di calendario differenti. L'effetto di popolazione è un buon indicatore dell'efficacia in pratica della terapia, ovvero dell'insieme di parametri quali l'efficacia reale, l'aderenza, la "copertura" della terapia antiretrovirale in una determinata popolazione. Inoltre, il continuo arruolamento di nuovi partecipanti ("coorte aperta") permette di valutare nel tempo come si va modificando la proporzione di sottotipi non-B nella popolazione e di identificare un eventuale aumento nella circolazione di ceppi resistenti alle terapie antivirali.

Trasferibilità dei risultati

L'*Italian Seroconversion Study* rappresenta un classico esempio di uno studio i cui risultati implicano un'ampia trasferibilità alla realtà clinica e alla sanità pubblica. In particolare: i) la quantificazione dell'aumento della sopravvivenza delle persone sieropositive permette di comunicare con maggior precisione la speranza di vita; ii) l'identificazione di marcatori di progressione clinica fornisce nuovi strumenti al clinico; iii) l'identificazione di determinanti di progressione permette di eliminare o contrastare eventuali fattori rimuovibili (es. coinfezioni, etc.); iv) la definizione dei tempi di incubazione dell'AIDS e della distribuzione dei tempi di sopravvivenza può contribuire alla costruzione di modelli matematici atti a stimare il carico globale dell'epidemia e le dinamiche temporali della stessa. Questi obiettivi possono essere perseguiti sia a livello nazionale dall'*Italian Seroconversion Study*, che a livello internazionale tramite *CASCADE*. Inoltre, lo studio della circolazione di specifici sottotipi virali e ceppi resistenti ai farmaci in un sottogruppo di pazienti fornisce utili elementi per la scelta della terapia d'attacco nelle persone sieropositive. Combinando i nostri dati con quelli di altre coorti europee (*CASCADE Virology*) è anche possibile valutare l'effetto della variabilità molecolare del virus sulla progressione clinica.

L'immunologia non-convenzionale della tubercolosi come base strategica di interventi immuno-profilattici/terapeutici innovativi

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 di uno dei principali meccanismi di evasione del *M.tuberculosis* (Mtb): la capacità di virare il proprio metabolismo in uno stato di dormienza che causa la TB latente. Lo *switch* implica una riduzione/abrogazione della sintesi di antigeni capaci di attivare quei linfociti T espansi durante le fasi precoci della malattia primaria. Inoltre, nella fase di dormienza sono prodotti nuovi antigeni che potrebbero avere proprietà antigeniche. Questo studio analizzerà la variazione nella composizione lipidica e proteica del Mtb associata allo *switch* della dormienza. In particolare, dal momento che non esistono dati in letteratura sull'antigenicità dei lipidi specifici della fase di dormienza, questo studio analizzerà la loro immunogenicità dopo isolamento da batteri cresciuti in condizioni anaerobiche che inducono la dormienza. L'immunogenicità verrà analizzata attraverso lo studio dell'attivazione di linee e cloni T CD1 ristretti. Verrà inoltre studiato il repertorio di linfociti T citotossici (CTL) e valutata la suscettibilità al *killing* T dipendente di batteri in replicazione o dormienti.

Risultati attesi nel triennio

Risultati attesi sono

l'identificazione di composti specifici della fase di dormienza 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.

La dimostrazione dell'effettiva capacità di stimolazione dei linfociti da parte di nuovi composti attraverso l'analisi della possibilità di stimolazione di cloni T specifici da parte di APC professioniste e non professioniste infettate da Mtb in fase replicativi o dormiente.

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 convenzionali e 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.

Laboratory analysis of sewage in areas of Italy with high risk of poliovirus importation

Lo studio si propone di verificare la possibile circolazione residua di poliovirus selvaggi o vaccino-derivati neurovirulenti in Italia dopo l'adozione del vaccino antipolio inattivato di Salk (IPV) nell'Agosto 2002. L'Italia è a rischio di importazione di questi virus da aree ove persistono focolai epidemici di polio selvaggio e da regioni in cui permane la vaccinazione con il vaccino Sabin. In Israele e altri paesi Europei, che adottano l'IPV, sono stati isolati dall'ambiente poliovirus vaccinali molto mutati, in assenza di casi clinici. Il progetto si propone

inoltre di valutare in Italia i livelli di contaminazione virale dei reflui in zone campione, al fine di definire la circolazione ambientale di enterovirus e virus enteritogeni. In accordo alle linee guida dell'OMS, lo studio prevede la raccolta di circa 1000 campioni di liquami o altri campioni in otto città localizzate al Nord, Centro e Sud Italia (Milano, Parma, Roma, Ancona, Sassari, Napoli, Bari e Palermo). I liquami saranno concentrati con metodiche di ultrafiltrazione molecolare a flusso tangenziale; dopo decontaminazione, saranno inoculati in cellule e i poliovirus e altri enterovirus isolati saranno sottoposti a identificazione e caratterizzazione con metodiche raccomandate dall'OMS. La presenza di retromutazioni nei ceppi di poliovirus isolati sarà verificata attraverso il sequenziamento del genoma virale. La presenza di ricombinazioni intratipiche e intertipiche sarà studiata con tecniche *microarray*.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto consentirà di stabilire presso l'ISS un centro nazionale di riferimento per la sorveglianza ambientale dei virus enterici e enteritogeni e la costituzione di una rete di Laboratori periferici accreditati, collaboranti con l'ISS, il Ministero della Salute e l'OMS. La raccolta di campioni di acque di diversa origine (reflue, destinate all'irrigazione, per usi economici e ricreativi) sarà effettuata secondo protocolli ottimizzati e standardizzati. Saranno introdotte tecniche innovative per la caratterizzazione molecolare dei virus. L'ISS effettuerà corsi di addestramento per operatori dei laboratori in grado di condurre indagini virologiche. Per una analisi più dettagliata sarà effettuato presso l'ISS il sequenziamento genomico. Sarà costitutivo un *database* con le sequenze ottenute, che consentirà il confronto con quelle relative a ceppi di referenza o a ceppi isolati nel corso di episodi epidemici e riportati nelle banche dati. Saranno localizzate aree a rischio e possibili sorgenti di contaminazione da poliovirus e altri enterovirus per la popolazione e valutata la possibile persistenza nell'ambiente di poliovirus selvaggi, vaccinali retromutati o ricombinanti con aumentata trasmissibilità. Saranno, inoltre, acquisiti dati sull'efficacia dell'immunizzazione antipolio in Italia e stabilite le condizioni per la certificazione dell'eradicazione della poliomielite e del poliovirus selvaggio in Italia.

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 all'OMS. 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 l'OMS.

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 referenza regionale del WHO polio LabNet europeo, per verificare l'assenza di casi di polio paralitica da virus selvaggi. Lo studio sarà condotto secondo le caratteristiche di efficienza e sensibilità richieste dall'OMS 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 l'OMS 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 cases* 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 all'OMS 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 Sanità e dell'OMS. Partecipazione a saggi di competenza *Proficiency test* proposti dall'OMS, consistenti nell'isolamento, identificazione e caratterizzazione di enterovirus presenti in campioni clinici preparati ad hoc. Organizzazione di *Proficiency test* per i laboratori di referenza sub-nazionali e nazionali afferenti alla rete di sorveglianza. Visite ispettive per l'accreditamento annuale dei laboratori sub- nazionali collaboranti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso articoli scientifici, linee guida e documenti ufficiali, e saranno utilizzati per la richiesta di certificazione "polio-free" dell'Italia e dei Paesi legati all'Italia all'OMS. 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 l'OMS.

Le malattie a trasmissione sessuale (MST): cambiamenti degli agenti eziologici, patologie emergenti, nuovi vaccini

Le MST comprendono un grande numero di patologie, molte delle quali emerse all'interesse scientifico nell'ultimo decennio. Gli unici dati nazionali disponibili sulle MST sono quelli relativi a sifilide e gonorrea (dati ISTAT), che tuttavia non sono attendibili a causa di una forte sottotifica dei casi. Nessun dato nazionale è disponibile invece sulle altre MST, quali condilomi genitali, *herpes genitale*, infezioni da *chlamydia*, ecc. In particolare, alcuni settori della ricerca scientifica richiedono un impegno urgente nel settore delle MST, quali:

- analisi della loro diffusione in specifici strati di popolazione
- rilevazione e studio di nuovi agenti eziologici o di varianti di microrganismi già noti
- identificazione di patologie emergenti o ri-emergenti
- sequele e complicanze che provocano a medio e lungo termine, dalla abortività, ai danni al prodotto del concepimento, alla sterilità
- problematiche connesse con le resistenze alle terapie antimicrobiche
- introduzione di nuovi vaccini preventivi o terapeutici
- analisi aggiornata del loro ruolo nel favorire sia l'acquisizione che la trasmissione dell'infezione da HIV nella nostra realtà nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Identificare sottogruppi a rischio d'infezione in aree geografiche specifiche

Descrivere le caratteristiche genotipiche e fenotipiche dei microrganismi causali di MST attualmente circolanti nel nostro Paese

Individuare nuovi agenti eziologici che causano MST

Valutare l'efficacia e l'appropriatezza dei protocolli terapeutici in uso, alla luce di studi sulla resistenza antimicrobica

Stimare i costi delle diverse patologie e delle complicanze associate

Studiare strategie vaccinali appropriate per prevenire l'acquisizione di alcune infezioni sessualmente trasmesse e/o le relative sequele (displasie, cancro, ecc.)

Valutare l'efficacia di campagne di prevenzione mirate alle MST nel ridurre la circolazione dell'infezione da HIV.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno essere utilizzati per:

- migliorare l'informazione sulle MST rivolta alla popolazione generale
- standardizzare i metodi di laboratorio utilizzati per l'identificazione di microrganismi trasmessi per via sessuale
- implementare i *test* diagnostici per le MST attraverso la diffusione di nuovi metodi di laboratorio
- effettuare valutazioni di costo-efficacia per le terapie antimicrobiche attualmente in uso
- condurre valutazioni sui costi delle singole patologie e delle complicanze ad esse associate
- proporre strategie vaccinali mirate alle popolazioni a maggior rischio di contrarre le infezioni prevenibili da vaccino
- mirare le attività di *counselling* e di *contact tracing* non solo alla prevenzione delle MST ma anche alla prevenzione dell'infezione da HIV.

Le patologie da allergia: sviluppo di strumenti diagnostici e terapeutici e valutazione della loro appropriatezza ai fini di una corretta gestione del paziente allergico (Progetto Art.12, DL.vo 502/92)

Il progetto affronta gli aspetti sottolineati nell'introduzione, integrando le competenze e le attività delle 8 unità operative interne all'ISS e afferenti al Laboratorio di Immunologia e al laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, ed esterne (prevalentemente di tipo clinico), e si propone di: acquisire dati epidemiologici nell'ambito delle patologie da allergia valutando la qualità e la appropriatezza dei vari approcci diagnostici; valutare il grado di reattività crociata delle varie componenti allergeniche presenti nei vari estratti e l'influenza di questo dato sui riscontri epidemiologici ottenuti; valutare il ruolo di molecole a sequenza conservata lungo l'intero arco degli allergeni di origine vegetale e animale (panallergeni) e il loro ruolo nelle polisensibilizzazioni; valutare la efficacia della immunoterapia specifica utilizzata precocemente nella prevenzione dell'aggravamento di forme allergiche lievi (rinite, oculorinite, ecc.); valutare l'efficacia della immunoterapia specifica nei casi di patologia allergica allo stato più avanzato-valutare gli approcci immunoterapeutici basati su vie di somministrazione non parenterali utilizzando anche modelli animali opportunamente sviluppati; valutare il ruolo di nuovi farmaci attivi sulla flogosi allergica acuta e cronica.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione e caratterizzazione di nuove fonti allergeniche. Sviluppo di metodi per la standardizzazione degli estratti allergenici con particolare riguardo a quelli per immunoterapia. Produzione di allergeni ricombinanti non-glicosilati e glicosilati e loro utilizzo a fini diagnostici e terapeutici. Studio dei meccanismi immunologici che regolano la risposta IgE verso epitopi allergenici. Prevalenza delle patologie da allergia. Allergie ai farmaci, soprattutto in relazione al

loro reale consumo nella popolazione, e alla prevalenza in popolazioni a rischio. Studi di ottimizzazione delle terapie farmacologiche singole, o in combinazione, nel controllo della sintomatologia nei diversi quadri clinici delle malattie da allergia, Immunoterapia specifica *versus* terapia farmacologica. Valutazione e studio di nuovi approcci terapeutici (anti-IgE, linfocine, anti-linfocine, immunoterapia orale, immunodeviiazione verso immunità Th1, ecc.) Ruolo delle cellule effettrici (mastociti, basofili), e dei mediatori primari e secondari della flogosi da queste prodotti, nella induzione e nel mantenimento delle patologie allergiche nell'uomo. Approcci immunofarmacologici per il controllo della flogosi allergica *in vitro* e *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

È stata chiaramente identificata e caratterizzata nel polline di Cipresso una nuova importante componente allergenica Cup a 1 di grande importanza. In tal senso sono stati prodotti anche anticorpi monoclonali ed è stato sviluppato un saggio per quantizzare la componente maggiore in tale estratto, che è stata anche prodotta per via ricombinante non glicosilata. Di tali molecole è stata valutata la potenzialità diagnostica e il prodotto ottenuto presenta numerosi vantaggi diagnostici. È stato messo a punto un modello animale per valutare vari approcci di immunizzazione e i risultati sono trasferibili allo studio di preparazioni ad uso umano. Sono state studiate le cellule che rilasciano mediatori chimici della anafilassi. È stata valutata l'efficacia della Immunoterapia sia per via iniettiva che per via non iniettiva, identificando possibili marcatori di efficacia negli anticorpi di classe IgG.

Le proteine della dormienza di *Mycobacterium tuberculosis* come possibili strumenti diagnostici e vaccinali

In seguito all'infezione da *M.tuberculosis* (Mtb) il 10% dei pazienti va incontro a tubercolosi (TB) mentre il 90% produce una risposta immunitaria senza malattia. In questo modo Mtb persiste in uno stato latente (dormiente) che può causare la riattivazione della malattia. La conoscenza che proteine prodotte da Mtb durante la dormienza (proteine della dormienza, PdD) siano sintetizzate in momenti diversi della malattia suggerisce un loro impiego nella discriminazione clinica tra varie fasi della TB. Inoltre, considerando che la dormienza può servire per eludere la risposta immunitaria contro le proteine precoci espresse in fase di attiva replicazione, è importante valutare se l'attivazione della risposta immunitaria verso le PdD possa potenziare quella ottenuta con la vaccinazione con BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) o con proteine precoci eliminando quella sacca di Mtb dormienti (1-10% nei modelli animali) che rendono possibile la persistenza di Mtb. Obiettivi del progetto sono: 1) Studiare il ruolo diagnostico delle PdD e/o i correlati di protezione in soggetti sani, PPD(+), vaccinati con BCG e malati di TB prima e dopo il trattamento antitubercolare; 2) Studiare in un modello murino l'immunogenicità e la protezione indotta da plasmidi codificanti per geni delle PdD in associazione con BCG e/o proteine precoci (Ag85B).

Risultati attesi nel triennio

Nell'uomo, lo studio della risposta immunitaria verso le PdD (in particolare alfa-cristallina) in momenti diversi dell'infezione e della malattia tubercolare potrebbe far capire se il sistema immune "vede" o meno (e quando) le PdD. Questi dati potrebbero essere importanti per comprendere se è possibile associare le PdD con le proteine precoci finora usate nei test diagnostici per la TB latente. Da un punto di vista vaccinale, l'eventuale aumento di protezione (rispetto alla protezione da BCG) in topi vaccinati con BCG o con proteine precoci (*priming*) e richiamati (*boosting*) con plasmidi codificanti per geni delle PdD, o viceversa, può essere utile per capire perché tutti i vaccini sperimentali noti, basati solo su proteine precoci, proteggono al massimo come BCG o poco di più. L'incapacità di tali vaccini e, probabilmente del BCG stesso,

di eliminare i pochi batteri dormienti residui (non replicanti) può essere la causa principale della persistenza della TB. L'uso di entrambi i tipi di proteine allo scopo di indurre una risposta immune in grado di eliminare sia Mtb in fase di attiva che dormiente costituisce l'innovazione principale del progetto.

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*

Meccanismi di evasione dal sistema interferon da parte di patogeni virali

Proprio per la estrema efficacia degli interferoni nel bloccare direttamente, a vari livelli, la replicazione di un gran numero di agenti virali, e la loro capacità di agire quali mediatori chiave all'interfaccia tra immunità innata e immunità acquisita, pressoché tutti i virus, per sopravvivere in natura, hanno sviluppato strategie in grado di sovvertire il sistema interferon. Tra le varie strategie, l'interferenza con il *pathway* di trasduzione del segnale, rappresenta un meccanismo di *escape* dagli effetti antivirali più a monte, in grado di bloccare allo stesso tempo più di una molecola effettrice e la produzione massiva di Interferon stesso. Particolare interesse si è recentemente concentrato sui fattori di trascrizione sia primari che secondari che vengono attivati in seguito al legame degli interferon ai loro recettori specifici sulla membrana cellulare, quali quelli della famiglia IRF che assieme alle STAT e a volte in combinazione con esse, giocano un ruolo fondamentale non solo nell'effetto antivirale, ma anche nei meccanismi di regolazione del sistema immune.

Il progetto riguarda lo studio dei meccanismi molecolari che controllano e collegano immunità innata e specifica ad alcuni patogeni e delle le strategie messe in atto per sovvertire tale risposta immune, in particolare il sistema Interferon, allo scopo di identificare bersagli molecolari e cellulari per strategie terapeutiche volte alla generazione di una risposta immune protettiva alle infezioni.

Risultati attesi nel triennio

Verranno utilizzati sia virus modello quali Sendai, VSV, NDV, che virus patogeni per l'uomo quali *Herpes*, e virus respiratori quali influenza e SARS-*coronavirus*.

Ci si propone di identificare:

- proteine virali in grado di interferire sul *pathway* di trasduzione del segnale dell'interferon di tipo I con particolare attenzione ai meccanismi volti a neutralizzare le due famiglie di fattori di trascrizione STAT e IRF responsabili di gran parte degli effetti antivirali e immunomodulatori dell'interferon.
- la modulazione dell'espressione di recettori TLR e la produzione di IFN nelle cellule bersaglio dei virus sopra indicati e nelle cellule Dendritiche responsabili della risposta innata.
- l'interferenza di proteine virali sulla produzione di citochine da parte di APC in grado di dirigere il differenziamento e la polarizzazione di cellule α T.
- la possibilità di dirigere il differenziamento di cellule Dendritiche attraverso la stimolazione e/o la repressione di geni specifici

Trasferibilità dei risultati

Gli studi volti a definire i marcatori di infettività, i meccanismi di patogenesi tra i quali l'evasione dal sistema immune, in generale, e dal sistema interferon, in particolare, dei virus patogeni oggetto dello studio sono la premessa indispensabile al fine di disegnare molecole attive nel bloccare la replicazione e lo *spreading* virale. Gli studi proposti permetteranno di disegnare nuove strategie terapeutiche attraverso l'uso di bersagli molecolari da utilizzare sia per diagnosi differenziali che per terapie appropriate e specifiche.

Microarray

Il progetto riguarda la messa a punto di una metodologia onnicomprensiva per la diagnostica sierologica di agenti infettanti. Esso prevede l'ottenimento delle proteine maggiori antigeniche di virus respiratori e agenti batterici di infezione respiratoria che sono depositate in un *array* e testate con nanometodologie verso sieri di soggetti sani o pazienti acuti, cronici o convalescenti per individuare quali delle proteine discriminano al meglio i diversi stati clinici. L'indagine iniziale comprende il proteoma di *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* e il virus della SARS.

Risultati attesi nel triennio

Ci si aspetta di ottenere uno o più *arrays* per la diagnosi sierologica differenziale, sullo stesso vetrino, delle infezioni respiratorie virali e batteriche più comuni.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni su riviste internazionali indexate e possibile produzione di brevetti. Trasferimento delle tecnologie di base al Servizio Sanitario Nazionale

Modelli sperimentali di studio della patogenesi e terapia delle infezioni da virus dell'epatite. Sviluppo di modelli *in vivo* e *in vitro* 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 >70% 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 a 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. Nel caso di infezione da HCV, la 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:

Lo 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*.

La 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 cellulo-mediata è propedeutico e indispensabile per lo sviluppo di approcci mirati ed eventualmente combinati nel settore della vaccino-terapia nell'infezione cronica da virus epatitici.

Modulazione profilattica e terapeutica della risposta IgE e della polarizzazione T in modelli murini di sensibilizzazione allergica

La conoscenza dei meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base della patogenesi delle malattie allergiche consente di delineare approcci integrati di immunodeviiazione, con i quali individuare modalità di vaccinazione profilattica o immunoterapeutica capaci di contrastare l'insorgenza o controllare la progressione delle patologie allergiche. La somministrazione mucosale (nasale o orale) di antigeni proteici in forma solubile induce uno stato di iporesponsività immunologica specifico per l'antigene, come è stato dimostrato in numerosi modelli *in vivo* di patologie autoimmuni con prevalente polarizzazione Th1. La situazione è molto meno definita nel caso di patologie a prevalente polarizzazione Th2, come le patologie allergiche IgE-mediate. In questo ambito, la presente linea si propone quindi di allestire e caratterizzare modelli murini di sensibilizzazione allergica verso allergeni nativi e ricombinanti, nei quali modulare la risposta IgE e la polarizzazione T mediante somministrazione nasale dell'allergene responsabile, sia in fase preventiva prima della sensibilizzazione che in fase terapeutica dopo la sua insorgenza.

L'impiego di allergeni mutati in modo da ridurre la capacità di legare le IgE, in confronto alla molecola *wild type*, senza alterarne la capacità di stimolare le cellule T, può fornire ulteriori strumenti utili alla modulazione *in vivo* della risposta Th2, incrementandone sia l'efficacia che la sicurezza, in vista della potenziale applicazione clinica. Ci si propone quindi di valutare l'attività immunomodulatoria *in vivo* di molecole allergeniche ibride dimeriche o trimeriche. Questi costrutti, prodotti mediante tecnologia del DNA ricombinante, presentano una elevata immunogenicità e una ridotta capacità di legare IgE mentre conservano la presenza degli epitopi T necessari per la stimolazione e la modulazione della risposta T.

L'associazione tra l'induzione mucosale di iporesponsività specifica e l'impiego di ibridi ipoallergenici potrebbe costituire un'interessante alternativa alla classica immunoterapia delle patologie allergiche IgE-mediate.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità dei saggi per la valutazione della risposta umorale e cellulare nel modello murino. Disponibilità degli allergeni ricombinanti da utilizzare per la immunomodulazione della risposta IgE ottenuta nel modello murino.

Conoscenza dei meccanismi che modulano la produzione di IgE. Caratterizzazione di molecole ipoallergeniche rilevanti ai fini della modulazione della risposta IgE. Disponibilità di un modello murino in cui valutare strategie di modulazione a fini profilattici o terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

La ricerca si propone di originare due tipi di risultati o prodotti potenzialmente trasferibili alla pratica clinica e al SSN a breve-medio termine:

1) Nuovi strumenti terapeutici per il controllo delle patologie allergiche, il cui meccanismo patogenetico origina da una disregolazione del sistema immunitario. Tali strumenti comprendono nuove molecole ipoallergeniche e l'induzione di non responsività specifica per

via mucosale, e hanno in comune una attività immunomodulatoria connessa alla capacità di agire su cellule dendritiche e di indurre cellule T regolatorie.

2) Definizione di parametri e di linee-guida per la selezione dei pazienti e il loro indirizzo alla strategia terapeutica più vantaggiosa.

Monitoraggio allergenico ambientale in diverse tipologie di ambiente *indoor*, e individuazione di nuove fonti allergeniche e di molecole panallergeniche

La prevalenza delle allergopatie respiratorie è stimata intorno al 15-30% della popolazione, mentre le patologie allergiche di origine alimentare colpiscono l'1-2% della popolazione adulta. Una serie di osservazioni e di studi epidemiologici mostra negli ultimi decenni una crescente prevalenza, nei Paesi a stile di vita occidentalizzato, delle patologie allergiche, messa in relazione con alcuni parametri ambientali, in primo luogo l'inquinamento atmosferico e il cambiamento negli stili di vita che induce la popolazione a trascorrere un grande numero di ore in ambienti confinati. Particolare importanza riveste l'attività di monitoraggio allergenico ambientale svolta in alcuni locali (laboratori e uffici) del Dipartimento al fine di valutare i livelli di esposizione agli allergeni *indoor*.

Risultati attesi nel triennio

messa a punto delle metodiche di valutazione del contenuto di allergeni *indoor* presenti in diverse tipologie di ambienti, attraverso il campionamento e l'analisi di polveri;

monitoraggio allergenico in diverse tipologie di ambiente *indoor*, con particolare attenzione ad alcuni ambienti lavorativi, anche per la relativa scarsità di dati sulla esposizione allergenica rispetto ad altri ambienti come quello domestico, e ad alcune fonti allergeniche qualificabili come professionali.

Trasferibilità dei risultati

Tale attività risulta particolarmente importante ai fini di segnalare una eventuale esposizione agli allergeni *indoor* al di sopra dei livelli soglia stabiliti dal "third International Workshop on Indoor allergens and Asthma", in modo da adottare le misure preventive previste in tali casi, ed evitare possibili rischi di sensibilizzazione allergica e/o scatenamento della sintomatologia allergica in quanti già sensibilizzati.

Monitoraggio dei fattori di rischio di diffusione delle leishmaniosi nel Bacino del Mediterraneo

Il progetto è un'azione coordinata di vari centri di riferimento per lo studio e il controllo delle leishmaniosi mediterranee. Queste malattie sono aumentate in incidenza e diffusione geografica, principalmente a causa di tre fattori di rischio: i) modificazioni ambientali ad opera dell'uomo, ii) fattori immunosoppressivi (specialmente l'infezione da HIV), e iii) resistenza dei parassiti ai farmaci di prima linea, gli antimoniali pentavalenti. Una sorveglianza multidisciplinare transnazionale di tali fattori è essenziale per i) un continuo aggiornamento e definizione del rischio, ii) la valutazione di adeguate misure di controllo e iii) l'orientamento delle priorità di ricerca di base e applicata.

Obiettivo generale:

- Creazione di un *network* multidisciplinare che riunisca *partner* di Stati europei dell'area Mediterranea, e Stati del Nord Africa e Medio Oriente della stessa area, con lo scopo di documentare i principali fattori di rischio per la diffusione delle leishmaniosi, e promuovere strategie di controllo transnazionali.

Obiettivi specifici:

- Esaminare e informare sulle attuali conoscenze scientifiche nel campo di epidemiologia e controllo delle leishmaniosi mediterranee;
- Individuare *gap* e coordinare le ricerche esistenti in tale campo;
- Favorire la standardizzazione delle procedure di indagine nei vari campi;
- Costituire punto di riferimento per le autorità sanitarie nazionali e sovranazionali.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono i seguenti:

- Organizzazione di 5 *workshop* ai quali partecipino 22 *partner* del consorzio Euro-Mediterraneo;
- Organizzazione di 3 brevi corsi di addestramento nel campo dell'epidemiologia molecolare, diagnosi e GIS/controllo ambientale;
- Costituzione di un Gruppo di esperti multidisciplinare;
- Produzione di *Reviews* e Linee guida

Trasferibilità dei risultati

Le priorità scientifiche e operazionali identificate dal consorzio costituiranno parte integrante di Linee guida per il controllo delle leishmaniosi in Italia

Monitoraggio della farmacoresistenza nei programmi di lotta alla malaria in Madagascar, Tanzania e Sudan e studio dell'interazione HIV/AIDS/malaria

Il progetto si colloca nell'ambito dell'attività del Centro Collaboratore dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) di ricerca e formazione operante presso il Reparto di malattie trasmesse da vettori e sanità internazionale. Le recenti raccomandazioni dell'OMS 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. Le basi molecolari della resistenza agli antimalarici non sono ancora tutti noti, ma sono stati identificati i geni e i punti di mutazione responsabili della resistenza. Due mutazioni, K76T e A220S, sono essenziali per la resistenza di *P. falciparum* alla cloroquina; mutazioni puntiformi nei geni per la diidrofolato reuttasi e diidropteroato sintetasi di *P. falciparum* sono associati alla resistenza alla sulfadossina-pirimetamina. Recenti pubblicazioni hanno messo in luce i possibili determinanti di resistenza ai derivati dell'artemisinina. La caratterizzazione genomica dei ceppi circolanti di *P. falciparum*, effettuata su un numero significativo di campioni di sangue raccolti su carta da filtro, sarà parte essenziale di questo progetto, insieme con le osservazioni clinico-biologiche sul rischio relativo di malaria nei soggetti HIV-positivi e dell'azione degli antiretrovirali inibitori delle proteasi sull'andamento dell'infezione malarica.

Risultati attesi nel triennio

Lo *screening* molecolare di isolati di *P.falciparum* raccolti nei paesi sopra menzionati e i risultati dei paralleli *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. In considerazione della elevata presenza di co-infezioni HIV/Malaria nei paesi dell'Africa Sub-sahariana, la valutazione dell'impatto dei farmaci antiretrovirali sull'andamento dell'infezione malarica ha una evidente importanza di sanità pubblica

Trasferibilità dei risultati

Dati di importanza vitale nella pianificazione degli interventi

MUVAPRED (*Mucosal Vaccines for Poverty Related Diseases*)

Un vaccino antitubercolare già esiste (*Bacillus Calmette Guerin*, BCG) ma è poco o nulla protettivo verso la malattia tubercolare. Per questo motivo, e in considerazione della grande diffusione della tubercolosi in tutto il mondo, è urgente la preparazione di un nuovo vaccino più efficace. Lo scopo principale di questa ricerca, la quale è inserita nel progetto europeo MUVAPRED (*Mucosal Vaccines for Poverty Related Diseases*), è di sviluppare formulazioni vaccinali per via mucosale (intranasale), le quali consentirebbero una vaccinazione rapida e semplice per il controllo della tubercolosi nonché dell'AIDS e della malaria in Paesi in via di sviluppo in cui queste tre malattie sono endemiche

Risultati attesi nel triennio

Ci si aspetta la generazione di uno o più candidati vaccinali contro la tubercolosi da utilizzare per vaccinazione mucosale

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche peer-reviewe. uno o più prodotti vaccinali saranno brevettati

***Neisseria meningitidis*: diagnosi microbiologica e sierologica, tipizzazione e monitoraggio delle resistenze agli antibiotici attraverso nuove metodologie molecolari**

Nell'ambito del Progetto "Sorveglianza delle Meningiti Batteriche" finanziato dal Ministero della Salute si è resa necessaria la messa a punto di metodologie molecolari per la diagnosi, la tipizzazione e il saggio di sensibilità agli antibiotici di *Neisseria meningitidis* con particolare riferimento a campioni clinici coltura negativi. Il numero di casi di meningite batterica ad eziologia sconosciuta è, infatti, aumentato negli ultimi anni dovuto soprattutto ad un più repentino uso di antibiotici all'inizio della sintomatologia clinica. Per un'adeguata sorveglianza si rende quindi necessario avere a disposizione tecniche per una rapida diagnosi e tipizzazione molecolare dell'agente eziologico. È anche auspicabile la possibilità di avere a disposizione metodi per l'individuazione di resistenze agli antibiotici normalmente in uso per la terapia e la profilassi della meningite meningococcica anche in quei casi in cui l'isolamento batterico sia risultato negativo. Per questo, obiettivo principale di questo studio è quello di individuare e utilizzare *target* nuovi per l'identificazione, tipizzazione molecolare e predittivi di resistenza a uno o più antibiotici direttamente in campioni di liquor e/o sangue. Questi *target* verranno utilizzati in PCR *realtime*, *MultiLocus Sequence Typing* e *PorA VR typing* per una completa caratterizzazione dei campioni coltura negativi. La diagnostica sierologica attraverso l'uso di ELISA su coppie di sieri acuto e convalescente permetterà anche di valutare la capacità battericida di sieri collezionati da pazienti con infezione da ceppi di *N. meningitidis* appartenenti a diversi fenotipi e genotipi.

Risultati attesi nel triennio

Da questa ricerca si intende individuare nuovi marcatori genici sufficientemente conservati nella popolazione batterica da poter essere utilizzati per una rapida diagnosi e tipizzazione molecolare di *N. meningitidis* direttamente in campioni clinici coltura negativi. L'utilizzo di approcci molecolari rapidi come la PCR *realtime* potranno sicuramente migliorare la capacità diagnostica nell'ambito delle meningiti meningococciche. La tipizzazione molecolare direttamente da campione clinico fornisce anche l'opportunità di classificare e confrontare a livello internazionale tutti i casi coltura negativi. Per gli studi che verranno realizzati su coppie di sieri, acuto e convalescente, si intende mettere a punto saggi ELISA per la valutazione della

capacità battericida di questi sieri in fasi diverse della malattia. Verranno anche valutate le attività *cross* reattive di sieri collezionati da malati infetti con ceppi di *N.meningitidis* appartenenti a specifici fenotipi e genotipi.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti da questo studio permetteranno, in primo luogo, di migliorare la sorveglianza a livello nazionale dei casi di meningite meningococcica anche nei casi coltura negativi o di confermare quelli ad eziologia incerta. Permetterà anche di fornire protocolli molecolari utilizzabili dai presidi periferici per una corretta diagnosi dei casi. La possibilità di individuare, attraverso tecniche molecolari direttamente sul campione clinico, resistenze a uno o più antibiotici fornirà un utile strumento per un miglior trattamento farmacologico sia per la terapia che per la profilassi dei casi di meningite meningococcica.

Network europeo per genomica comparativa e funzionale di *Bordetella pertussis* (Azione concertata-UE)

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'Azione Concertata (CA) di 13 Laboratori di riferimento e di ricerca appartenenti a nove diversi Paesi europei. Visto il risorgere della pertosse, malattia prevenibile da vaccinazione, in diversi Paesi europei, Australia, Canada e USA dovuta sia all'aumentato numero di ceppi di *B. pertussis* varianti sia a un aumentato numero di casi tra gli adolescenti e adulti, è importante monitorare i cambiamenti nella popolazione batterica e studiare l'impatto di questi cambiamenti nella prevenzione e incidenza della malattia. *Microarray*, ibridazione sottrattiva e transcriptoma risultano essere efficaci approcci per comparazioni genomiche. La necessità non solo di trovare nuovi approcci molecolari ma anche di armonizzarne l'utilizzo per la conoscenza dei meccanismi di patogenesi e di trasmissione di *B. pertussis* è uno degli scopi fondamentali di questa ricerca. L'azione concertata prevederà di mantenere e sviluppare un *network* interattivo tra diversi Paesi europei con politiche vaccinali antipertosse differenti.

Risultati attesi nel triennio

Questa Azione Concertata è la continuazione e espansione di un *network* europeo preesistente, *Eupertstrain*, che ha come obiettivi e risultati principali quelli di aumentare le conoscenze relative alla genomica funzionale di *B. pertussis* oltre a implementare la sorveglianza e la collezione di ceppi di isolamento clinico. I profili di espressione differenziale che potranno essere messi in evidenza e in correlazione a diverse condizioni ambientali e di evoluzione di *B. pertussis* nella popolazione umana, saranno un valida piattaforma per la valutazione di strategie vaccinali nuove per una malattia che è prevenibile da vaccinazione. Lo studio interattivo, tra i vari partecipanti sulle diverse tematiche inserite nel progetto, permetterà di identificare nuovi *target* per la diagnosi, la terapia e la prevenzione della pertosse. In particolare, gli obiettivi e i risultati che la nostra unità di ricerca intende ottenere, sono quelli di valutare l'espressione differenziale di antigeni di superficie espressi in fasi diverse durante l'infezione, nonché la capacità opsonizzante e battericida di sieri collezionati da bambini affetti da pertosse.

Trasferibilità dei risultati

La natura stessa di questa Azione Concertata fornisce uniche opportunità per lo studio di ceppi batterici ben caratterizzati e isolati in diversi Paesi europei. La genomica comparativa permetterà di evidenziare geni responsabili di una maggiore virulenza tra i ceppi e, causa di epidemie. L'armonizzazione delle tecnologie che verranno utilizzate dai vari gruppi di lavoro permetterà di comparare risultati ottenuti da diversi ceppi di *B.pertussis* di isolamento clinico.

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.

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* si basa sulla sovversione del differenziamento dei monociti in cellule dendritiche (DC) indotta dal trattamento con IFN di tipo I e GM-CSF. Le DC sono cellule che svolgono un ruolo cruciale nell'induzione della risposta immunitaria cellulo-mediata contro il *Mycobacterium tuberculosis*. Pertanto, inibendo la generazione di DC funzionalmente attive il *Mycobacterium tuberculosis* verrebbe a bloccare anche la risposta T-specifica. Questa ipotesi è stata confermata da esperimenti *in vitro* utilizzando linfociti T CD4 espansi con DC derivate da monociti infettati con il *Mycobacterium tuberculosis*. Questi linfociti, a differenza di quelli ottenuti da DC infettate con *Mycobacterium tuberculosis*, non rilasciano IFN-gamma venendo a mancare in questo modo lo stimolo fondamentale per l'induzione dell'attività *killing* dei macrofagi verso i patogeni intracellulari.

Gli IFN di tipo I, inizialmente identificati per il loro potenziale antivirale, sono stati recentemente caratterizzati per la capacità di modulare la risposta immunitaria attraverso la regolazione della proliferazione, differenziamento e maturazione di diverse popolazioni leucocitarie agendo in tal modo come *link* tra immunità innata e quella acquisita. Un aspetto interessante, che abbiamo definito in questi anni, è relativo all'osservazione che se da un lato il *Mycobacterium tuberculosis* è capace di indurre l'espressione selettiva dei geni dell'IFN di tipo I dall'altro mette in atto strategie per inibirne il *signalling* e, di conseguenza, gli effetti immunomodulatori in monociti, macrofagi e DC.

Risultati attesi nel triennio

- Sulla base di queste evidenze i risultati del nostro progetto consentiranno di:
 - caratterizzare i meccanismi molecolari che sottendono l'inibizione del differenziamento dei monociti infettati con il *Mycobacterium tuberculosis* in DC;
 - effettuare un'analisi comparativa del trascrittoma indotto dall'IFN di tipo I in monociti di controllo *versus* monociti infettati il *Mycobacterium tuberculosis*;
 - valutare il ruolo funzionale dei linfociti T indotti dalle DC derivate da monociti infettati con *Mycobacterium tuberculosis*;
 - identificare possibili *target* 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 del *Mycobacterium tuberculosis* utilizzata per inibire gli effetti indotti dall'IFN di tipo I nei monociti. Infatti, la caratterizzazione dei meccanismi molecolari che determinano la mancata responsività all'IFN di tipo I nelle cellule infettate con il *Mycobacterium tuberculosis* consentirà di individuare e, possibilmente, correggere gli eventi del *signaling* che risultano alterati.

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.

Nuovi tools per la modulazione dello sviluppo di cellule T regolatorie

Le cellule T regolatorie sono componenti essenziali e importanti regolatori dei processi alla base dell'induzione e del mantenimento della tolleranza immunologica.

Conosciute da lungo tempo come mediatori della tolleranza verso auto-antigeni ma riconosciute attive anche verso antigeni estranei e agenti infettivi, queste cellule, solo recentemente sono state riconsiderate come possibili strumenti terapeutici per il trattamento di un crescente numero di patologie umane. 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 grazie gli studi sui meccanismi molecolari alla base del loro differenziamento e attività, si è aperta la possibilità di 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. Nostri studi recenti indicano come alcuni effettori della risposta agli Interferoni, in particolare il fattore di trascrizione appartenente alla famiglia *Interferon Regulatory Factors*, IRF-1, sia responsabile *in vivo*, del mancato sviluppo di cellule T regolatorie CD4+CD25^{high} e di cellule dendritiche immature/plasmacitoidi, cellule, in grado a loro volta, di stimolare una risposta T soppressoria.

Risultati attesi nel triennio

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}.

Definizione del ruolo e dei meccanismi molecolari attraverso i quali IRF-1 è in grado, direttamente od indirettamente, di modulare lo sviluppo di cellule T regolatorie.

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 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.

La possibilità, pertanto, di manipolare e programmare non solo cellule dendritiche, ma anche cellule T regolatorie, rappresenta uno strumento terapeutico estremamente utile.

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 una loro manipolazione e per lo sviluppo di reagenti specifici quali ad esempio RNA interferenti in grado di reprimere un eccessivo o indesiderato sviluppo di cellule T reattive favorendo allo stesso tempo lo sviluppo di una marcata risposta T soppressoria.

Nuovo vaccino influenzale mucosale

Questo progetto mira alla produzione di uno o più prodotti vaccinali anti-influenzali nasali innovativi basati sull'uso di sistemi carrier e adiuvanti quali i virosomi che aumentino immunogenicità e efficacia delle subunità vaccinali del virus influenzale, permettendone l'uso per via mucosale

I principali elementi di novità di questo vaccino saranno:

l'uso di virosomi come sistema *carrier* adiuvante

l'uso di altri adiuvanti innovativi, in particolare l'uso di un adiuvante mirato ad aumentare la risposta immunologica cellulo-mediata nell'anziano

l'uso della somministrazione per via mucosale nasale

l'eliminazione completa del rischio di generare virus nuovi (pandemie da virus *shift*) e di disseminare virus vaccinali nell'ambiente durante le campagne di prevenzione.

Risultati attesi nel triennio

La scelta della somministrazione mucosale, l'uso dei virosomi ottenibili in grandi quantità e facilmente standardizzabili e la selezione di altri sistemi adiuvanti adeguati sono fattori che permetteranno di mettere a punto un prodotto vaccinale capace di indurre una protezione mucosale (IgA) adeguata, una forte immunità sistemica sia umorale che cellulare e di evocare pertanto una risposta immunitaria il più possibile simile a quella dell'infezione naturale che elimina il virus e impedisce la sua trasmissione da soggetto a soggetto. Le caratteristiche salienti del prodotto vaccinale che deriverà da questo progetto sono:

- l'uso dei virosomi come sistema adiuvante e di *delivery* mucosale
- l'assenza nel prodotto vaccinale di virioni capaci di replicare (assenza di virus vivi attenuati)
- l'assenza di conservanti o antibiotici (riduzione della diffusione indiscriminata di resistenze agli antibiotici nei batteri ambientali)
- l'assenza di proteine derivate dall'uovo di gallina (elimina il rischio di reazioni allergiche)
- la somministrazione per *spray* nelle mucose nasali
- la maggiore tollerabilità per i soggetti da vaccinare conseguente alla somministrazione mucosale;
- la conseguente maggiore espansione della vaccinazione a tutti i soggetti che ne abbiano l'indicazione
- l'induzione di una protezione immunitaria mucosale adeguata nella sede di ingresso naturale dell'infezione influenzale, cioè la produzione di IgA specifiche per gli antigeni presenti nel vaccino sulla superficie della mucose delle vie aeree;
- il blocco della trasmissione dell'agente patogeno e del contagio
- l'induzione di una risposta immunitaria efficace e sostenuta nel tempo grazie alla stimolazione contemporanea dell'immunità umorale e cellulare;
- l'eliminazione completa del rischio di generare nuovi virus (*genetic shift*) durante la campagna vaccinale; questo rischio è tipico dei vaccini basati sull'uso di virus vivi che possono ricombinarsi con virus aviari nei soggetti vaccinati e di conseguenza generare virus in grado di indurre pandemie;
- l'induzione di livelli di anticorpi sierici chiaramente al di sopra di quanto fissato dagli *standard* internazionali;
- una riduzione della quantità di virioni liberati dalla mucosa dei soggetti infetti mille volte superiore a quella dei soggetti non vaccinati;
- una riduzione della malattia causata dall'infezione influenzale pari all'85%.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento alla Sanità Pubblica per una nuova procedura di immunizzazione contro l'influenza

Omeostasi immunitaria della mucosa intestinale e sue variazioni in corso di malattie infiammatorie croniche

La perdita della tolleranza verso la propria flora batterica rappresenta un momento patogenetico fondamentale nell'instaurarsi delle malattie infiammatorie croniche intestinali

(morbo di Crohn e colite ulcerosa). Variazioni della permeabilità intestinale (primitive o secondarie) sembrano concorrere al mantenimento dell'anomala risposta verso la propria flora batterica. La tolleranza mucosale è mediata da numerosi meccanismi distinti, ma interagenti fra loro quali l'eliminazione mediante apoptosi delle cellule antigene-specifiche, l'instaurarsi di uno stato di anergia verso gli antigeni residenti e lo sviluppo di una soppressione attiva. Quest'ultima si attua attraverso le interazioni delle cellule regolatorie T e dei loro prodotti solubili (TGF- β e IL-10), con le componenti induttive e effettrici della risposta immune. Lo scopo del presente progetto è quello di valutare 1) l'effetto sulla prevalenza e il tipo delle cellule regolatorie di interventi che inducano variazioni della flora intestinale (somministrazione di batteri probiotici) e/o della permeabilità intestinale, 2) l'effetto della modulazione delle cellule regolatorie sulla suscettibilità alla colite sperimentale

Risultati attesi nel triennio

Ulteriore definizione degli effetti immunomodulanti dei batteri probiotici. Acquisizione di informazioni sull'effetto sulle cellule T regolatorie di variazioni della permeabilità intestinale e loro relazioni con la suscettibilità alla colite.

Trasferibilità dei risultati

Possibilità di individuare nuove strategie terapeutiche tendenti alla espansione di cellule T regolatorie nella profilassi delle riacutizzazioni cliniche delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Ottimizzazione del saggio CHO per determinare l'attività biologica dei vaccini anti "pertosse cellulari" (Module 1 e 2 of ECVAM's Modular approach to validation)

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 *B. pertussis*, somministrata per via intracerebrale (Kendrick's test), con la quantità di una preparazione di riferimento, titolata in UI, necessaria per ottenere la stessa protezione. Lo scopo di questo studio è quello di sostituire la seconda parte del saggio di attività (challenge intracranico) con un metodo sierologico mediante il quale determinare gli anticorpi neutralizzanti la tossina pertossica. Si ritiene di poter utilizzare a tale scopo il saggio di neutralizzazione *in vitro* che viene eseguito utilizzando una coltura di cellule di "chinese hamster ovary" (CHO) che sono sensibili alla tossina pertossica.

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.

Risultati attesi nel triennio

Mediante tale studio si intende verificare se il saggio di neutralizzazione potrà servire a stabilire l'attività biologica di un vaccino al controllo. I livelli anticorpali antitossina pertossica indotti dal vaccino in esame dovranno essere uguali o superiori a quelli indotti dal vaccino di riferimento che ha superato il saggio di attività biologica eseguito con il Kendrick's test. Il saggio prevede la determinazione di anticorpi funzionali e quindi dovrebbe aversi una correlazione con il saggio *in vivo*.

Lo studio prevede la partecipazione anche di un laboratorio esterno ad ISS al fine di validare il saggio, non solo per la ripetibilità, ma anche per la riproducibilità.

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 utilizzarsi durante la fase di "Batch Release" di un vaccino da parte degli "Official Medicine Control Laboratory".

Polisaccaridi capsulari e lipooligosaccaridi batterici per il monitoraggio e il possibile controllo delle infezioni croniche ostruttive delle vie respiratorie

Le cause di maggiore suscettibilità dei pazienti con malattia polmonare cronica ostruttiva (COPD) alle infezioni batteriche possano essere molteplici. L'alterazione della continuità e funzionalità della mucosa e in particolare l'alterata fisiologia del sistema muco-ciliare, aggravata da cofattori come il tabagismo, è certamente fra le cause più rilevanti. Un'efficiente risposta immunitaria capace di eradicare le infezioni potrebbe infatti migliorare la sintomatologia, il recupero anatomico-funzionale della basse vie respiratorie limitando la progressione verso le forme ostruttive e distruttive della struttura alveolare eridurre l'uso di farmaci. Scopo di questa proposta è l'analisi dell'eventuale difetto nella risposta umorale specifica e la verifica *in vitro* della possibilità di potenziarla attraverso una vaccinazione innovativa. Come modello si analizzeranno in particolare *S.pneumoniae* e *H.influenzae*, patogeni batterici frequentemente isolati in corso di COPD. Polisaccaridi (PS) e lipooligosaccaridi (LOS) sono antigeni timo indipendenti, in grado di stimolare una risposta anticorpale specifica, ma in modo poco modulabile e con scarsa o assente memoria immunologica. In particolare si valuterà la risposta di linfociti B isolati dal sangue periferico/tonsille di pazienti con COPD o normali (tonsillectomizzati) a rispondere *in vitro* a PS e LOS e la capacità di immunomodulatori come oligonucleotidi sintetici contenenti CpG motifs (ODN-CpG) di ripristinare la risposta.

Risultati attesi nel triennio

Ottenere la dimostrazione che la stimolazione di linfociti B *in vitro* in assenza di linfociti T *helper* ma in presenza di CpG motif possa indurre una produzione di anticorpi anti polisaccaride. Ottenere la dimostrazione che la sintesi di anticorpi nel modello sperimentale sia associata ad un cambiamento della classe e sottoclasse di Ig prodotte.

Determinare la sottopopolazione di linfociti B *target* della stimolazione polisaccaride-CpG.

Porre la basi per la fattibilità e utilità di un vaccino polisaccaridici non coniugato efficace nella prevenzione delle infezioni in corso di COPD

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno trasferiti alla comunità scientifica tramite gli usuali canali di comunicazione a convegni e pubblicazioni su riviste internazionali qualificate. Nuovi prodotti di potenziale validità vaccinale e diagnostica saranno sottoposti a procedure brevettuali. Tutte le conoscenze di potenziale impatto clinico saranno trasferite alla periferia (ASL, IRCCS, Policlinici Universitari ecc).

Potenziamento della rete di sorveglianza virologica dell'influenza umana e di alcuni laboratori del network per l'implementazione della diagnostica delle polmoniti virali

In Italia, in seguito all'accordo sancito dalla Conferenza Stato-Regioni del 28 settembre 2000 (Atto n. 1031), è attivo un *network* di sorveglianza integrata clinico-epidemiologico e virologico dell'influenza. In periodo interpandemico la sorveglianza virologica è prioritariamente finalizzata all'identificazione delle varianti antigeniche emergenti e al conseguente aggiornamento della composizione vaccinale. Tuttavia, il numero sempre maggiore di casi di influenza aviaria riconducibili al salto di specie con il conseguente rischio di adattamento

all'uomo di un virus a potenzialità pandemica, l'emergere di nuovi patogeni a trasmissione aerea quali il SARS-CoV, nonché la necessità di porre la sorveglianza dell'influenza dentro il vasto tema generale della sorveglianza delle virosi respiratorie, richiedono i) l'implementazione della rete di sorveglianza virologica dell'influenza affinché sia in grado di coprire l'intero territorio nazionale e possa monitorare la circolazione dei virus influenzali in tutte le classi d'età, ii) l'estensione della sorveglianza ai soggetti in contatto con il serbatoio animale, iii) la standardizzazione delle metodologie di rilevamento e caratterizzazione e iv) una diagnostica più rapida e accurata dei cluster di polmoniti e influenza-like illness, che potrebbero rappresentare il primo segnale dell'introduzione di un virus emergente o ri-emergente nella comunità.

Risultati attesi nel triennio

L'implementazione dell'attività di sorveglianza prevista dal progetto permetterà una migliore e più precoce attivazione della risposta di Sanità Pubblica, con particolare riferimento all'emergenza di stipiti pandemici.

La messa a punto di nuove e più rapide metodiche di diagnosi molecolare delle infezioni virali delle vie aeree superiori e inferiori, con particolare attenzione alle forme atipiche di polmonite, permetterà di:

- identificare precocemente agenti etiologici emergenti o ri-emergenti
- contenere e controllare il rischio di diffusione del virus in caso di pandemia
- migliorare il *management* del paziente alla luce delle terapie antivirali disponibili, riducendo il periodo di ricovero e abbattendo il rischio di complicanze
- permettere la messa in atto delle misure di prevenzione delle infezioni a trasmissione aerea, riducendo il rischio di trasmissione intra-ospedaliera di patogeni aerogeni e, quindi, il rischio di complicanze e il periodo di ricovero nei contatti del caso

Trasferibilità dei risultati

Le metodiche sviluppate saranno trasferite ai laboratori della rete periferica attraverso attività di *training* e formazione tecnico/scientifica degli operatori sanitari partecipanti. Sarà quindi possibile procedere a standardizzazione a livello nazionale delle metodiche di laboratorio utilizzabili in periodo interpandemico e/o in situazioni di emergenza pandemica. I dati ottenuti saranno resi disponibili attraverso pubblicazioni scientifiche e utilizzati per l'elaborazione di linee guida e documenti ufficiali utilizzabili in ambito nazionale e internazionale.

Preparing for an influenza pandemic - FLUPAN

Il progetto FLUPAN fa parte del Quinto Programma Quadro "qualità *Life and Management of Living Resources*", articolato in sei Unità Operative.

Gli obiettivi principali del Progetto FLUPAN possono essere così suddivisi:

- Identificazione e caratterizzazione molecolare dei sottotipi virali circolanti nei serbatoi animali (uccelli selvatici, domestici, suini) in EU, e loro relazioni evolutive con virus isolati nel Sud-Est Asiatico. Selezione di ceppi virali per uso vaccinale
Sviluppo di ceppi vaccinali da virus ad alta patogenicità mediante *reverse genetics* (vaccino GM).
- Produzione di un vaccino GM su substrato cellulare
- Allestimento di saggi sierologici innovativi per l'identificazione di anticorpi contro l'influenza aviaria nell'uomo

Risultati attesi nel triennio

Risultati scientifici previsti:

I risultati finora ottenuti hanno portato, a partire da ceppi virali isolati e caratterizzati dalla nostra U.O., alla messa a punto di un vaccino GM (Re3) specifico contro un virus aviario ad alta patogenicità, simile a quelli trasmessi all'uomo nel S.E. Asiatico. In questo modo il Progetto

FLUPAN ha gettato le basi per la risposta dell'OMS alle emergenze dell'H5N1 (RG H5N1 2003 e 2004). Nell'ambito dell'attività svolta dalla nostra U.O., gli studi di caratterizzazione molecolare di stipiti virali aviari hanno documentato fenomeni di trasmissione interspecie da uccelli selvatici a domestici, un passaggio essenziale perché un virus aviario possa trasmettersi all'uomo. Infine, la messa a punto di *test* sierologici nuovi ha permesso di identificare casi di infezione umana subclinica con virus aviari. Tra gli obiettivi futuri:

- Caratterizzazione molecolare di virus influenzali circolanti in ospiti selvatici finalizzata alla identificazione di possibili scambi genetici con virus asiatici legati ai flussi migratori
- *Trial* clinici del vaccino Re3 e studio dei correlati della protezione virale.
- Messa a punto di nuovi meccanismi di *delivery* dei vaccini pandemici, finalizzata al massimo risparmio di antigene.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle ricerche saranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni scientifiche e partecipazione a congressi.

Prodotti microbici in grado di modulare le funzioni di cellule dendritiche, l'interazione con proteine virali di HIV-1 e i processi di infezione

È ormai chiaro che alcuni patogeni, direttamente o attraverso sostanze prodotte, sono in grado di sovvertire le funzioni delle cellule dendritiche (DC). La proposta di ricerca è volta a valutare se prodotti di origine microbica possano interferire con le funzioni delle DC, favorendo o meno la patogenicità del virus dell'immunodeficienza acquisita di tipo 1 (HIV-1).

Si valuterà, con particolare attenzione, la possibilità che interazioni multiple esercitate sulle DC risultino in attività funzionali delle stesse che possano favorire od ostacolare l'infezione da HIV-1. Si intende anche valutare l'eventuale interferenza con le funzioni primarie delle DC in quanto cellule regolatrici della risposta immune, per esempio la presentazione degli antigeni al comparto T. Per questo scopo si studieranno le possibili interazioni sinergiche fra prodotti di origine microbica e le proteine immunomodulatrici di HIV-1 nel modulare le attività funzionali di DC umane di origine monocitaria (DC) e plasmacitoide (pDC). Si intende, inoltre, valutare la suscettibilità delle DC all'infezione da virus o la loro capacità di funzionare da promotori di infezione di altri tipi cellulari in presenza dei prodotti microbici prescelti.

Risultati attesi nel triennio

Si prevede di caratterizzare l'azione esercitata dai prodotti microbici quali lipopolisaccaride (LPS), Lipide A, beta-glucano, tossina della pertosse detossificata (dPT), lipoarabinomannani (LAM) (di alcuni dei quali sono già note proprietà immunomodulanti per potenziale uso terapeutico) sull'espressione di marcatori e funzioni di DC coinvolte nell'interazione con HIV-1. L'attenzione si focalizzerà su recettori presenti sulle DC già noti per il loro coinvolgimento nella patologia AIDS. In particolare si vuole chiarire il ruolo del CD38, dei recettori della famiglia delle lectine di tipo C (CLR) (DC-SIGN e MR), dei recettori "Toll like" (TLRs) (TLR2 e TLR4) e dei recettori per le chemochine.

Inizialmente si studierà l'interazione di tali prodotti microbici con proteine di HIV-1, in particolare gp120, Nef e Tat, nell'indirizzare l'attività regolatoria di DC umane con particolare attenzione alla loro capacità di polarizzare la risposta citochinica e di potenziare l'induzione di risposte citotossiche specifiche per HIV-1. Questa fase servirà a identificare i prodotti microbici più promettenti. Sarà poi studiato il loro effetto sull'infezione diretta delle DC da parte di ceppi virali HIV-1 R5 o X4, o l'infezione mediata da DC di altri tipi cellulari. Si intende in particolare valutare se tali prodotti microbici possano avere un ruolo nell'espansione di ceppi virali R5 o X4 in prospettiva del passaggio da *slow* a *rapid progressor* nell'AIDS.

Trasferibilità dei risultati

Si intende identificare prodotti microbici in grado di contrastare l'azione immunosoppressiva esercitata dall'HIV-1 durante l'infezione. Conoscenze in questo campo possono portare a nuove strategie di eliminazione del virus HIV-1. Obiettivo finale sarà la messa a punto di una strategia, possibilmente curativa, che porti all'induzione di una polarizzazione della risposta immune, naturale e adattativa, in grado di promuovere risposte protettive contro l'infezione da HIV-1.

Produzione e caratterizzazione di molecole allergeniche ricombinanti

Le attuali forme di diagnosi e di immunoterapia specifica delle malattie allergiche vengono correntemente effettuate con estratti allergenici. Sia per l'attuazione di misure preventive che per l'applicazione di una appropriata diagnosi e di una corretta terapia specifica, è di fondamentale importanza la valutazione della qualità e sicurezza dei materiali diagnostici e terapeutici.

La biologia molecolare applicata alla produzione degli allergeni ricombinanti ha apportato notevoli vantaggi nel campo della diagnosi allergologica. Un aspetto importante è che utilizzando in diagnosi, in sostituzione all'estratto, un pannello più ampio possibile di allergeni purificati ricombinanti può essere determinato il profilo individuale di sensibilizzazione del paziente, e quindi è possibile identificare le molecole responsabili della patologia caso per caso, permettendo in questo modo di effettuare una *component-resolve diagnosis* sia *in vivo* che *in vitro*. Inoltre gli allergeni ricombinanti consentono un trattamento basato sul profilo individuale di sensibilizzazione del paziente allergico (*component-resolve immunotherapy*), evitando la somministrazione dell'estratto allergenico totale il quale, oltre alle componenti specifiche per l'immunoterapia, presenta altre componenti potenzialmente allergizzanti.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione biochimica e immunochimica di estratti allergenici da fonti inalanti e alimentari, e messa a punto di metodi per la valutazione della loro stabilità, in funzione del tempo, in relazione alla capacità degli estratti stessi di legare le IgE;

Produzione di allergeni ricombinanti; caratterizzazione della reattività immunologica di forme native e ricombinanti di allergeni da pollini o da sorgenti *indoor*, con particolare riferimento alla comparazione tra l'allergene ricombinante e la sua controparte nativa, a livello delle caratteristiche biochimiche e strutturali e della loro reattività immunologica.

Trasferibilità dei risultati

Gli allergeni ricombinanti prodotti e caratterizzati potranno essere utilizzati per lo sviluppo di sistemi *microarray* per la diagnosi molecolare delle patologie allergiche. Inoltre gli stessi potranno essere impiegati per valutare *in vivo* mediante modelli animali modalità innovative di immunoterapia

Progetto "AIDS & Mobility - National Focal Point" Linea di ricerca rivolta a studi psico-socio-comportamentali sulla popolazione non italiana

La Commissione Europea, dal 1991, finanzia il "Progetto *AIDS & Mobility*", coordinato dal *Netherlands Institute for Health Promotion and Disease Prevention-NIGZ*.

Tale progetto ha permesso di realizzare la prima Rete europea tra istituzioni pubbliche, organizzazioni non governative e associazioni di volontariato impegnate in interventi di prevenzione, cura e supporto relativamente all'infezione da HIV/AIDS/MST e popolazioni mobili. Ciò è stato possibile attraverso la costituzione in ogni Stato membro di un *National Focal Point* (NFP). In Italia il compito di costituire e coordinare il NFP è stato affidato, nel 1997, al Telefono Verde AIDS. La collaborazione integrata tra esperti di organizzazioni governative e non, presenti nel NFP, consente di realizzare progetti di ricerca e corsi di

formazione, focalizzando l'attenzione non solo sugli aspetti epidemiologici, preventivi, diagnostico-clinici, legislativi, ma anche comunicativo-relazionali. Particolare attenzione è stata posta all'analisi delle caratteristiche comportamentali e all'individuazione dei bisogni di salute dei cittadini stranieri, regolari e non, in merito all'infezione da HIV/AIDS/MST, nonché all'identificazione delle risposte fornite dalle strutture impegnate nella lotta all'AIDS presenti sul territorio nazionale. È prioritaria un'analisi e una valutazione della relazione operatore sanitario italiano/persona straniera per promuovere un approccio transculturale nel rispetto della persona e delle sue differenze.

Risultati attesi nel triennio

1. Individuare i bisogni e gli aspetti di criticità riguardanti la salute del cittadino straniero regolare e non, in riferimento all'infezione da HIV/AIDS/MST. 2. Migliorare la qualità e l'efficacia di programmi di promozione della salute delle popolazioni non italiane, anche attraverso la diffusione di informazioni relative all'infezione da HIV/AIDS/MST. 3. Stimolare la collaborazione integrata tra ONG, Associazioni di Volontariato, Comunità di migranti e Istituzioni Pubbliche presenti nel Paese. 4. Confrontare e valutare strategie di intervento più efficaci messe in atto in aree geografiche del Nord, del Centro e del Sud Italia. 5. Individuare indicatori per un intervento efficace nella relazione tra operatore sanitario e persona straniera regolare e non. 6. Mettere a punto una metodologia *standard* e condivisa attraverso percorsi di formazione per gli operatori impegnati nella lotta all'AIDS. 7. Valutare il livello di soddisfazione e il grado di consenso espresso dalle persone straniere, regolari e non, che afferiscono alle strutture per l'infezione da HIV/AIDS/MST. 8. Individuare buone prassi per l'attuazione di programmi di prevenzione e di intervento a tutela della salute del cittadino straniero regolare e non.

Trasferibilità dei risultati

Il raggiungimento dei risultati può consentire un monitoraggio dei bisogni di salute dei cittadini stranieri, regolari e non, per l'attivazione di campagne informativo-educative e di interventi preventivi *ad hoc*, nonché una risposta più efficace a tali bisogni, attraverso il miglioramento dell'accesso e della fruibilità dei servizi e lo sviluppo e la diffusione di buone prassi. Inoltre, l'attivazione di spazi di confronto tra esperti del settore potrebbe favorire il superamento di problemi legati alla frammentazione e alla sovrapposizione di interventi realizzati negli anni, nonché costituire una base di conoscenze e riflessioni utili anche in altri contesti nazionali e europei. Infine, tali risultati possono consentire la produzione di linee-guida per l'attivazione di interventi finalizzati alla riduzione del rischio infettivo da HIV/AIDS/MST in gruppi vulnerabili.

Progetto Nazionale Epatiti Virali

Il progetto rimane attivo con lo scopo di sviluppare, con un approccio coordinato tra vari gruppi di ricerca nazionali, le recenti acquisizioni delle ricerche sul genoma umano e le nuove tecnologie molecolari per ricerche e trasferimenti applicativi nei settori della diagnosi, prevenzione e terapia delle patologie epatiche associate ad infezioni virali. Tali ricerche dovranno essere orientate alla caratterizzazione di nuovi virus e relativa definizione del potenziale epatopatico, alla valutazione dei nuovi approcci di vaccino-terapia e all'applicazione di appropriate metodologie diagnostiche.

Recentemente le "Librerie di Acidi Nucleici o di Espressione Differenziale" hanno assunto notevole rilievo nella caratterizzazione di nuovi agenti virali. Questi metodi sono utilizzati per identificare i campioni in cui il virus è presente attraverso l'amplificazione di tutti gli acidi nucleici tramite PCR e il successivo confronto, con saggi immunologici, delle reattività osservate nei confronti degli specifici prodotti codificati dalle sequenze ottenute. Nell'ambito

degli studi effettuati negli ultimi anni sul genoma umano sono state progressivamente ottenute banche di sequenze genomiche di elevato valore conoscitivo. Gli approcci sperimentali basati sull'analisi di microscopici allineamenti di DNA identificati con reazioni di ibridazione con sonde molecolari formulate *ad hoc* possono permettere l'analisi simultanea e il confronto dei profili di espressione di migliaia di geni.

Risultati attesi nel triennio

La valutazione di diverse associazioni di infezioni, includenti i nuovi virus potenzialmente epatotropici e virus con prevalente *target* epatico, potrà portare all'identificazione di categorie di infezioni singole e multiple caratterizzate dal più elevato livello 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 nel settore della vaccino-terapia.

Vaccini innovativi basati sull'espressione e la produzione di molecole caratterizzate da un più ampio spettro antigenico, sull'utilizzazione di nuovi sistemi *carriers* o nuovi adiuvanti o includenti l'uso di molecole ad attività citochinica potrebbero essere valutati in categorie di pazienti *non-responders* o *ipo-responders*.

Il progetto è basato sulla pluriennale collaborazione instaurata con vari Gruppi nazionali del preesistente progetto nazionale Epatiti Virali dell'ISS. Obiettivi specifici sono:

La caratterizzazione di nuovi agenti virali associati ad epatiti. Valutazione del ruolo nell'evoluzione patologica anche in relazione a infezioni multiple;

Lo studio di approcci innovativi di terapia combinata e vaccino-terapia per le infezioni da HBV;

Gli studi per lo sviluppo di nuovi vaccini e nuove formulazioni vaccinali.

Trasferibilità dei risultati

L'incremento delle cognizioni patogenetiche per le infezioni da HBV e HCV basato sulla maggiore definizione degli aspetti della risposta cellulare oltre che umorale dell'ospite e in rapporto alle caratteristiche della replicazione e delle popolazioni virali potrà portare unitamente alla disponibilità di nuovi preparazioni immunogeniche e nuovi farmaci antivirali all'applicazione di mirate terapie combinate.

Prospettive per il trattamento della criptosporidiosi e della toxoplasmosi: identificazione di nuove molecole bersaglio

Tra le infezioni opportunistiche di natura parassitaria, la criptosporidiosi (*Cryptosporidium spp.*) e la toxoplasmosi (*Toxoplasma gondii*) rappresentano tutt'ora un problema per la mancanza di una terapia di scelta per la prima e per la gravità e elevata prevalenza della seconda, contro la quale sono disponibili farmaci attivi prevalentemente sui tachizoiti di *T. gondii* e non sui bradizoiti, che rappresentano le forme di resistenza localizzate nel sistema nervoso centrale. Ne consegue l'importanza dello sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Nelle sue varie componenti sperimentali il progetto mira allo sviluppo di una terapia anti-*Cryptosporidium* e anti-*T. gondii* attraverso tre principali settori di indagine.

Il primo punto prevede l'analisi dell'attività anti-*Toxoplasma* degli inibitori della proteasi (IP) del virus HIV e l'identificazione, caratterizzazione e espressione di aspartil proteasi di *T. gondii* e *Cryptosporidium spp.* quali potenziali bersagli degli IP. Questo approccio sperimentale è supportato da risultati ottenuti dal nostro gruppo e da altri sull'azione diretta degli IP anti-HIV verso alcuni agenti opportunisti.

Il secondo aspetto del progetto riguarda lo studio del ruolo svolto nel processo d'invasione da parte delle proteine adesive *Thrombospondin-Related Adhesive Protein-1* (TgTRP-1) di *T.*

gondii e Cpa135 di *C. parvum*, da noi recentemente identificate. Per l'espressione eterologa della proteina Cpa135 abbiamo recentemente messo a punto un sistema d'espressione inducibile in *Giardia duodenalis*.

Il terzo punto prevede l'identificazione di nuove proteine antigeniche dello stadio invasivo (sporozoita) di *Cryptosporidium spp.* tramite l'identificazione di peptidi immunogenici ricombinanti.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di un sistema in vitro per l'induzione del differenziamento di *T. gondii* da tachizoita a bradizoita.

Messa a punto di un test ELISA per valutare il tasso di crescita in vitro di tachizoiti e bradizoiti.

Valutazione dell'attività inibitoria in vitro degli IP verso gli stadi di tachizoita e bradizoita di *T. gondii*.

Identificazione e analisi del profilo di espressione di geni codificanti per aspartil proteasi di *T. gondii* e *C. parvum*.

Espressione eterologa di aspartil proteasi di *T. gondii* e *C. parvum*.

Studio della sensibilità delle aspartil proteasi parassitarie ricombinanti ai diversi IP mediante saggi di inibizione *in vitro*.

Identificazione di nuove proteine immunogeniche presenti nello stadio di sporozoita di *C. parvum*.

Espressione di frammenti ricombinanti della proteina TgTRP-1 in *E. coli*.

Produzione di anticorpi policlonali e monoclonali anti-TgTRP-1.

Immunolocalizzazione di TgTRP-1 negli stadi invasivi di *T. gondii*.

Localizzazione della proteina Cpa135 di *C. parvum* durante il processo di secrezione da parte dello sporozoita.

Espressione eterologa di Cpa135 intera e di frammenti di essa in *T. gondii* e in *Giardia duodenalis* per lo studio strutturale e funzionale della proteina.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà a informare il personale del 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.

Per quanto riguarda l'individuazione di aspartil proteasi parassitarie, le conoscenze acquisite potranno essere fornite all'industria per l'eventuale produzione di inibitori specifici.

Le proteine immunogeniche di *Cryptosporidium spp.* identificate potranno essere testate in saggi immunologici come possibili candidati per la formulazione di vaccini per la criptosporidiosi.

Qualità e sicurezza dei prodotti biologici e del plasma destinato alla produzione di emoderivati

Il progetto proposto è la naturale continuazione dei precedenti e va inquadrato nell'ambito dell'attività istituzionale svolta dal reparto Prodotti Biologici, che non si limita al controllo di routine, ma fronteggia situazioni emergenti di sanità pubblica. Il progetto sarà così articolato:

Valutazione dei problemi connessi alla sicurezza del plasma nei confronti di microrganismi emergenti/riemergenti e sviluppo di tecniche per il loro rilevamento.

Messa a punto di metodi *in vitro* per la misura dell'attività biologica delle immunoglobuline alternativi a quelli *in vivo* descritti in Farmacopea Europea (FE).

Studi di fattibilità per la sostituzione del saggio di FE per l'attività biologica dell'interferone alfa-2 (INF-alfa2), con un metodo di cromatografia liquida ad alta pressione.

Messa a punto e convalida di metodi innovativi per la misurazione dell'attività di prodotti immunobiologici ottenuti mediante tecnologia del DNA ricombinante.

Definizione di nuovi standard e preparazioni di riferimento e/o messa a punto di nuove metodiche di FE in collaborazione con organismi internazionali.

Sviluppo e calibrazione di nuove preparazioni di riferimento nazionali per le metodiche di amplificazione genica (NAT) per il rilevamento di virus trasmissibili attraverso il sangue e organizzazione di studi di *External Quality Assessment* (EQA).

Risultati attesi nel triennio

Acquisizione di metodiche per il rilevamento di microrganismi che possano avere un impatto sulla sicurezza del plasma e dei suoi derivati (WNV, *chlamydia*, malaria ecc.).

Possibilità di misurare l'attività biologica delle immunoglobuline e dell'INF-alfa2 con metodi alternativi a quelli previsti dalla FE.

Acquisizione di saggi innovativi per il controllo dei prodotti immunobiologici ottenuti mediante tecnologia del DNA ricombinante.

Disponibilità di *standard* internazionali, preparazioni di riferimento e/o nuovi metodi di FE.

Costituzione di una banca di preparazioni di riferimento nazionali per HBV, HIV, HCV calibrate in UI/ml.

Trasferibilità dei risultati

La ricaduta dei risultati derivanti dal progetto di ricerca proposto, alla luce del largo impiego e dell'importanza terapeutica dei prodotti immunobiologici, sarà di notevole importanza al fine di:

- migliorare l'efficacia dei controlli sui materiali di partenza e sui prodotti finiti;
- disporre di preparazioni di riferimento nazionali utilizzabili dai laboratori universitari, dai centri trasfusionali, ecc. per la convalida dei metodi o come controlli interni di qualità, al fine di verificare la performance delle singole seute analitiche;
- ottimizzare la sorveglianza su virus e microrganismi trasmissibili con il sangue;
- disporre di *test* alternativi ai metodi *in vivo*, per il controllo dei prodotti biologici in ottemperanza alle direttive europee;
- migliorare le capacità di verificare la consistenza di produzione di specialità medicinali complesse, quali rIFN-a2 e anticorpi monoclonali;
- valutare, attraverso gli studi di EQA, la *performance* dei produttori di emoderivati e dei centri trasfusionali nel rilevare virus potenzialmente presenti nei pool di plasma.

Infine, la disponibilità di metodi innovativi per determinare la *potency* di prodotti immunobiologici da DNA ricombinante rappresenterà un ulteriore passo per garantire una sempre maggiore affidabilità di questi prodotti che trovano una crescente applicazione per il trattamento e la prevenzione di patologie infettive, immunologiche e oncologiche.

Resistenza agli antibiotici in batteri gram-positivi di rilevanza clinica: determinanti di resistenza e fattori di diffusione

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza negli ultimi anni ha subito una grossa accelerazione. Oggi molte specie batteriche clinicamente rilevanti sono resistenti ad antibiotici che una o due decenni fa erano ancora considerati di prima scelta per il trattamento e l'antibiotico-resistenza è considerata uno dei principali problemi di sanità pubblica nel mondo.

Il concetto che l'acquisizione di antibiotico-resistenza conducesse a una diminuita *fitness* del batterio, e che questo fosse svantaggiato rispetto a ceppi sensibili in assenza dell'antibiotico, è stato smentito dalla dimostrazione che il batterio resistente può essere un patogeno "di

successo” in tutte le situazioni, grazie al suo *background* genetico particolarmente adattato, alla presenza di diversi determinanti di resistenza e alla presenza addizionale di fattori di virulenza.

Lo scopo del progetto è duplice: conoscere la frequenza in Italia dell’antibiotico-resistenza in batteri gram-positivi di rilevanza clinica, soprattutto rispetto ad antibiotici che sono stati, e in parte sono tutt’ora, usati per il trattamento delle infezioni; e studiare i meccanismi di resistenza più diffusi, nonché i fattori che possano favorire la diffusione dei ceppi resistenti. Lo studio comprenderà quindi la raccolta di ceppi clinici, isolati soprattutto da sepsi o infezioni respiratorie di diversa provenienza geografica e la loro caratterizzazione mediante test fenotipici e genotipici.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio renderà possibile seguire il trend dell’antibiotico-resistenza in Italia per batteri gram-positivi di rilevanza clinica e mettere in rapporto la sua diffusione con la presenza di particolari determinanti/elementi di resistenza o fattori di virulenza. Risultati specifici saranno:

Frequenza di resistenza ai macrolidi in *Streptococcus pneumoniae* e in altri streptococchi. Determinazione dei determinanti di resistenza e degli elementi che li veicolano, con particolare riguardo all’associazione tra geni per l’efflusso e trasposone Tn916. Descrizione di nuovi geni di resistenza e/o nuove associazioni e nuovi trasposoni compositi.

Frequenza di resistenza ai glicopeptidi in *Enterococcus spp.* di isolato da infezioni contratte in ambito ospedaliero. Determinazione della possibile associazione tra resistenza ai glicopeptidi e fattori di virulenza noti o putativi in ceppi di enterococchi di diversa provenienza (ceppi ospedalieri, ceppi isolati da animali).

Messa a punto e applicazione di tecniche di tipizzazione molecolare di ceppi di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), con particolare riguardo al riconoscimento di ceppi comunitari, che rappresentano un problema emergente, e sono dotati di nuovi fattori di virulenza. Valutazione della circolazione in Italia di ceppi comunitari di MRSA.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dal progetto saranno trasmessi al Servizio Sanitario Nazionale utilizzando veicoli di ampia diffusione, quali sito web dell’ISS o pubblicazioni dell’ISS. La conoscenza tempestiva dei *trend* dell’antibiotico-resistenza in importanti patogeni nel nostro paese è di grande importanza per impostare corrette terapie empiriche e linee guida e per valutare politiche di contenimento. La partecipazione a progetti finanziati dalla UE, richiederà la comunicazione dei dati anche a livello europeo, allo scopo di comparare i trend nei diversi paesi. I dati rilevanti riguardanti i determinanti di resistenza e/o i fattori di virulenza saranno comunicati alla comunità scientifica internazionale mediante pubblicazioni scientifiche su riviste indicizzate nel campo della microbiologia, biologia molecolare e infettivologia.

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 e i risultati hanno contribuito a migliorare la diagnosi immunologica e a chiarire il complesso rapporto ospite-parassita. Il presente progetto si propone l’approfondimento dello studio dell’interazione del sistema immunitario con il parassita elminta *Echinococcus granulosus* per migliorare la diagnosi e approfondire i meccanismi immunopatologici. I risultati potranno contribuire da un lato ad ampliare i dati sperimentali e epidemiologici disponibili sulle elmintiasi, dall’altro a sviluppare nuove strategie per la diagnosi e la terapia. Obiettivi principali: 1. Migliorare la diagnosi e il monitoraggio della echinococcosi cistica: a questo scopo verranno utilizzati antigeni nativi e ricombinanti in tecniche abitualmente in uso. 2. Valutare la risposta cellulare e il rapporto ospite-parassita

Risultati attesi nel triennio

I risultati dei nostri studi potranno contribuire da un lato ad ampliare i dati sperimentali e epidemiologici disponibili sulle elmintiasi, dall'altro a sviluppare nuove strategie per la diagnosi e la terapia e di conseguenza migliorare la qualità e la quantità della vita nei numerosi paesi del mondo nei quali la parassitosi oggetto di studio è endemica. 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 Isolamento e caratterizzazione di molecole costitutive di *E.granulosus* con attività enzimatica e non e valutazione del loro ruolo nella complessa relazione ospite-parasita. 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

Trasferibilità dei risultati

Industrie farmaceutiche

Ruolo degli elementi genetici mobili nella diffusione della resistenza agli antimicrobici

Il trasferimento orizzontale rappresenta il più frequente meccanismo di diffusione delle resistenze agli antibiotici. Il fenomeno della resistenza multipla ad antimicrobici è legato alla diffusione di molecole di DNA (integroni, trasposoni, plasmidi) che veicolano simultaneamente diversi geni di resistenza. È ormai ampiamente dimostrato che l'acquisizione dei geni di resistenza avviene grazie a questi elementi genetici che ne mediano la mobilitazione promuovendone il trasferimento tra batteri di specie diversa. Questi elementi genetici si sono evoluti e continuano ad evolversi mediante l'acquisizione di nuovi geni di resistenza e di nuove combinazioni di geni.

Lo scopo di questo progetto europeo (contratto EU LSHM-CT-2005-018705, finanziamento triennale 2006-2008) è quello di caratterizzare gli elementi genetici di fondamentale importanza per la diffusione dei determinanti di resistenza agli antimicrobici in patogeni rilevanti per l'uomo. L'unità dell'ISS ha il compito di studiare i plasmidi come veicoli di antibiotico resistenza. A differenza di altri progetti di ricerca basati sulla rilevazione dei geni di resistenza in collezioni più o meno rappresentative di batteri, l'obiettivo di questo progetto è quello ricercare gli elementi che muovono i geni di resistenza, di determinarne le caratteristiche peculiari anche mediante lo sviluppo di nuove tecnologie che possano essere utilizzate come strumenti diagnostici innovativi.

Risultati attesi nel triennio

La caratterizzazione molecolare degli elementi genetici mobili consentirà di individuare i determinanti genetici più comuni e più frequenti nelle popolazioni di batteri circolanti in Europa. L'informazione ottenuta potrà essere utilizzata per disegnare strategie innovative atte alla rilevazione precoce, al monitoraggio e alla prevenzione della disseminazione dell'antibiotico resistenza.

I risultati attesi per l'Unità Operativa ISS sono:

Sviluppo di nuovi metodi per la classificazione dei plasmidi basato sull'amplificazione per PCR dei geni che controllano la replicazione plasmidica

Ricerca e caratterizzazione di plasmidi che conferiscono la resistenza a farmaci di rilevanza per l'uomo quali i beta-lattamici, gli aminoglicosidi e i macrolidi, circolanti in batteri Gram-negativi multiresistenti di origine comunitaria e nosocomiale

Rilevazione di plasmidi diffusi, emergenti, a largo spettro d'ospite, responsabili della diffusione di geni di resistenza rilevanti da un punto di vista clinico

Epidemiologia molecolare europea di plasmidi epidemici rilevanti per il tipo o per il numero di geni di resistenza veicolati, correlando la loro diffusione con i fenomeni di trasmissione animale-uomo o nell'ambito della circolazione nosocomiale delle resistenze agli antibiotici.

Trasferibilità dei risultati

I prodotti attesi dal progetto sono: la rilevazione degli elementi genetici più diffusi responsabili dell'insorgenza di resistenze agli antimicrobici e lo sviluppo di tecnologie diagnostiche complementari per una caratterizzazione più ampia e completa del fenomeno della resistenza agli antimicrobici.

Le innovazioni tecnologiche potranno essere trasferite al Servizio Sanitario Nazionale per implementare schemi diagnostici e di caratterizzazione dei batteri patogeni.

La determinazione di particolari caratteri di epidemicità, virulenza, diffusione globale di alcuni elementi, potrà avere importanti ripercussioni sulle scelte dei trattamenti farmacologici dei principali patogeni di rilevanza clinica per l'uomo, con indicazione di quali farmaci possono essere più efficaci e a minore rischio di fallimento terapeutico.

Ruolo dei fattori di trascrizione cellulari IRFs (*Interferon Regulatory Factors*) e NF- κ B nella patogenesi dell'AIDS e nello sviluppo delle neoplasie associate

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 gioca un ruolo essenziale. I risultati da noi finora ottenuti hanno evidenziato un ruolo altrettanto importante, di alcuni fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia IRFs, in particolare IRF-1 e IRF-8, sia nella trascrizione basale che nella riattivazione dalla latenza. IRF-1 che funziona da transattivatore positivo dell'espressione virale, è, inoltre, in grado di interagire sia fisicamente che funzionalmente con NF- κ B e con il transattivatore virale Tat sia sull'LTR che su promotori di geni cellulari. Il progetto riguarda il potenziale utilizzo dei fattori di trascrizione cellulari NF- κ B e IRFs quali target molecolari e modulatori del sistema immune in nuove strategie terapeutiche. Obiettivo sarà, pertanto, da una parte la realizzazione di sistemi in grado di bloccare selettivamente la sintesi e l'attività di tali fattori nelle cellule *target* dell'infezione, e dall'altra la possibilità di utilizzare alcuni IRFs, già noti giocare un ruolo importante nella modulazione del sistema immune, quali adiuvanti genetici e immunomodulatori nella vaccinazione con Tat/DNA.

Risultati attesi nel triennio

determinazione dei fattori coinvolti nella stimolazione dell'espressione di IRF-1 da parte di HIV-1 e dell'inibizione dell'attivazione della via di trasduzione del segnale di NF- κ B nelle cellule esprimenti il super-repressore I κ B- α .

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 in grado di inibire in maniera specifica e selettiva i fattori IRF-1,-2 e la subunità p65 di NF- κ B.

Costruzione di vettori lentivirali in grado di esprimere tali sequenze di RNA in cellule primarie.

Verifica della capacità di IRF-1, IRF-3 e IRF-7 di modulare, *in vivo*, la risposta umorale e cellulare specifica diretta contro la proteina Tat e loro possibile uso come adiuvanti genetici nella vaccinazione con antigeni a DNA.

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 la proposta di valutare l'utilità dell'uso di vettori di espressione per IRF-1, IRF-3 e IRF-7 come adiuvanti nella vaccinazione plasmidica contro la proteina Tat, può fornire un valido contributo volto al miglioramento dell'efficienza di tale vaccinazione e alla sua introduzione su larga scala come alternativa al vaccino attualmente in sperimentazione che utilizza la proteina purificata.

Ruolo dei prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) nei meccanismi autoimmuni in corso di aterosclerosi associata a diabete mellito, con particolare riguardo alla salute della donna in età post-menopausa

Evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato il ruolo della risposta immune verso antigeni *self* o *self*-modificati nella patogenesi dell'aterosclerosi. Il sistema immunitario funziona diversamente nell'uomo e nella donna, la quale presenta anche differenze legate alla situazione ormonale. Le influenze del sesso nella relazione tra infiammazione, fattori di rischio e aterosclerosi non sono state ancora completamente chiarite. Un fattore di rischio per l'aterosclerosi è rappresentato dal diabete mellito, le cui complicanze vascolari sono dovute in parte ad un danno ossidativo correlato all'iperglicemia, la quale può condurre alla formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs). Le modificazioni proteiche dovute a glicazione e ossidazione potrebbero rendere antigeniche molecole endogene e avere un ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi. Recentemente abbiamo dimostrato che la forma ossidata della beta2-glicoproteina (b2-GPI), una glicoproteina plasmatica responsabile di risposte autoimmuni nell'aterosclerosi, induce la maturazione di cellule dendritiche (CD) umane. Scopo generale del presente progetto è quello di contribuire alle conoscenze dei meccanismi di modificazione delle proteine (ossidazione e glicazione) implicate nella patogenesi dell'aterosclerosi con particolare riguardo alla associazione tra aterosclerosi e diabete nella donna.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso, qualora venissero individuati fenomeni autoimmuni associati ad antigeni *self* modificati in seguito a glicazione avanzata dovuta ad iperglicemia, è la validazione dell'ipotesi eziopatogenetica autoimmune dell'aterosclerosi in pazienti affetti da diabete. In particolare verrà caratterizzata l'interazione del prodotto finale della glicazione avanzata della b2-GPI (AGE-b2-GPI) con cellule dendritiche umane e verrà valutato il ruolo di tale proteina quale bersaglio di fenomeni autoimmuni (umorali e cellulari) nei pazienti con aterosclerosi associata a diabete mellito. Verrà inoltre valutata l'influenza del quadro ormonale sui fenomeni autoimmuni associati all'aterosclerosi studiando donne in pre- e in post-menopausa. Un altro

importante risultato sarà la messa a punto di strategie di immunomodulazione in vitro delle cellule dendritiche per ottenere la tolleranza specifica alla AGE-b2-GPI.

Trasferibilità dei risultati

Il trasferimento applicativo nella pratica clinica delle conoscenze acquisite consisterebbe nello sviluppo di nuovi strumenti biologici di intervento preventivo e riparativo che interferiscano con meccanismi putativi del danno vascolare associato a diabete mellito, con particolare riguardo alla salute della donna. L'utilizzo di cellule dendritiche tollerogeniche potrebbe costituire una valida strategia terapeutica per l'aterosclerosi associata diabete mellito.

Ruolo delle strutture batteriche di superficie nella patogenesi delle infezioni opportunistiche

Nel corso del triennio 2002-2004 verrà valutato il ruolo di possibili fattori di virulenza, quali i recettori per le proteine della matrice e lo slime, nella patogenesi delle infezioni sostenute da *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Saranno inoltre studiate le strutture recettoriali cellulari riconosciute da *Enterococcus* in rapporto all'adesività e all'invasività batterica. È in progetto anche un'analisi, a livello post-genomico, per l'individuazione di strutture di superficie di enterococchi possibilmente coinvolte nella virulenza. I dati ottenuti permetteranno di valutare il ruolo di alcuni possibili fattori di virulenza e delle strutture recettoriali coinvolte nella patogenesi di tali infezioni opportuniste. La caratterizzazione molecolare, genetica e ultrastrutturale di tali strutture permetterà la produzione di anticorpi monoclonali specifici e di antagonisti ai recettori cellulari per immunoterapie alternative agli antibiotici e per modulare la virulenza di questi opportunisti. In particolare, saranno perseguiti i seguenti obiettivi, che verranno resi disponibili alla comunità scientifica mediante pubblicazioni: 1) valutazione della diffusione della capacità di esprimere recettori MSCRAMMs e di produrre slime tra isolati clinici di *Enterococcus* e *Staphylococcus*; 2) individuazione delle condizioni di crescita in grado di stimolare l'espressione di questi fattori; 3) valutazione dell'effetto di concentrazioni sub-MIC di antibiotici sull'espressione di MSCRAMMs e sulla produzione di slime; 4) caratterizzazione, mediante PCR e metodi fenotipici, di enterococchi di isolamento clinico per i pattern dei fattori di virulenza espressi; 5) valutazione delle capacità adesive/invasive di isolati clinici di enterococchi su cellule dell'ospite e identificazione delle strutture cellulari coinvolte; 6) caratterizzazione molecolare, ultrastrutturale e genetica delle strutture individuate.

Risultati attesi nel triennio

I fattori di virulenza e le strutture recettoriali individuati nel corso del primo anno saranno sottoposti a caratterizzazione molecolare, genetica e ultrastrutturale; sarà, inoltre, valutata la possibilità di produrre anticorpi monoclonali specifici verso i fattori di virulenza identificati, i quali saranno analizzati in funzione della possibilità di utilizzarli come bersagli per immunoterapie alternative al trattamento antibiotico. Sarà valutata anche la possibilità di utilizzare antagonisti dei recettori cellulari individuati allo scopo di modulare la virulenza di questi microrganismi.

Screening di popolazioni di pazienti allergici con particolare riferimento all'esposizione ambientale

La prevalenza delle allergopatie respiratorie è stimata intorno al 15-30% della popolazione, mentre le patologie allergiche di origine alimentare colpiscono l'1-2% della popolazione adulta. Una serie di osservazioni e di studi epidemiologici mostra negli ultimi decenni una crescente prevalenza, nei Paesi a stile di vita occidentalizzato, delle patologie allergiche, messa in relazione con alcuni parametri ambientali, in primo luogo l'inquinamento atmosferico e il

cambiamento negli stili di vita. Per quanto riguarda gli ambienti confinati, risulta particolarmente appropriata l'attività di *screening* di popolazioni di soggetti afferenti ad ambienti sottoposti a monitoraggio allergenico al fine di valutare un eventuale relazione tra esposizione e sensibilizzazione. Inoltre studi epidemiologici sono necessari anche per valutare la prevalenza complessiva delle sensibilizzazioni allergiche.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione della prevalenza di sensibilizzazione verso i più comuni allergeni e di una eventuale relazione tra esposizione e sensibilizzazione mediante screening di popolazioni di soggetti afferenti ad ambienti monitorati. Inoltre, tra gli obiettivi proposti, sono inclusi indagini epidemiologiche su popolazioni selezionate mediante somministrazione di questionari al fine di valutare e monitorare gli andamenti temporali della prevalenza e la severità dell'asma e delle malattie allergiche e indagare i possibili fattori eziologici.

Trasferibilità dei risultati

In contatto con unità cliniche presenti sul territorio, si intende continuare l'attività relativa alla segnalazione e allo studio di sorgenti nuove o sottovalutate di sensibilizzazione allergica emergenti, e della prevalenza di sensibilizzazione verso differenti fonti allergiche in popolazioni sia adulte che pediatriche.

SIGMAL Targeting malaria transmission through interference with signaling in *P. falciparum* gametocytogenesis

Caratterizzazione molecolare della trasduzione del segnale in gametociti precoci di *Plasmodium falciparum*. Identificazione e caratterizzazione cellulare/molecolare di nuovi prodotti genici del parassita indotti specificamente nella gametocitogenesi precoce. Caratterizzazione funzionale di domini della proteina Pfg27, specifica dei gametociti precoci, coinvolti nel legame con l'RNA, nella omodimerizzazione e nelle interazioni di Pfg27 con altre proteine, attraverso la produzione di parassita *knock out* per Pfg27 e la espressione esogena di proteine Pfg27 mutanti in tali domini. Determinazione degli effetti biologici di composti ottenuti da "chemical libraries" sulla funzione di Pfg27 e sulla produzione di gametociti.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di nuove proteine del parassita attivate nello sviluppo sessuale del parassita quali potenziali bersagli farmacologici per interventi di blocco della trasmissione del parassita. Identificazione di siti funzionali sulla proteina Pfg27 e di inibitori specifici in grado di interferire con la sua attività essenziale alla formazione del gametocita.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di composti capaci di interferire con la produzione di gametociti con l'obiettivo di sviluppare nuovi farmaci anti-trasmissione da associare ad antimalarici convenzionali per combattere la diffusione di mutanti farmacoresistenti di *P. falciparum*.

Sorveglianza delle infezioni da virus respiratori

Le infezioni a carico dell'apparato respiratorio, oltre ad essere una delle principali cause di mortalità a livello mondiale, sono tra le patologie più frequentemente osservate a livello del medico pratico, con una incidenza in apparente aumento. Tali patologie, a causa della elevata incidenza, hanno anche un notevole impatto economico e costituiscono una delle più importanti cause di ore di lavoro e di scuola perse. Al fine di far fronte alla mancanza di informazioni relative all'andamento e all'eziologia delle cosiddette "sindromi influenzali", è stato pianificato un sistema di sorveglianza basato su medici sentinella in diverse aree italiane, prevenendo l'esame virologico del tampone faringeo per i pazienti febbrili. Al fine di valutare la fattibilità di

siffatto progetto, nell'inverno 2004/05 è stato effettuato uno studio pilota nella provincia di Roma, coinvolgendo 10 medici o pediatri di base. Sono stati raccolti 172 tamponi faringei (65 a dicembre 2004 e 107 tra gennaio e febbraio). Il virus influenzale è stato isolato rispettivamente nel 25% e nel 54% dei campioni raccolti nei due periodi. Due campioni erano positivi per VRS e 4 per adenovirus. Indagini su altri virus a RNA sono tuttora in corso. Tale studio dimostra che il progetto è fattibile anche se va esteso ad altre aree del Paese e va valutata criticamente la rappresentatività della popolazione in studio.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale consiste nel descrivere gli andamenti delle infezioni respiratorie acute attribuibili a specifici agenti virali.

Gli obiettivi specifici della sorveglianza sono:

- Costituire una rete di medici sentinella in grado di rilevare l'andamento delle infezioni respiratorie acute;
- Descrivere, in termini di spazio, tempo e persona, l'andamento dei casi di malattia osservati dal campione di medici sentinella;
- Stimare tassi di incidenza delle infezioni respiratorie acute nel tempo;
- Verificare la circolazione dei diversi virus mediante identificazione eziologia degli agenti patogeni da campioni biologici prelevati dai pazienti affetti da patologie respiratorie;
- Descrivere l'andamento stagionale degli isolamenti virali e identificare il periodo di massima circolazione di agenti virali specifici;
- Stimare la frazione attribuibile di casi di infezioni respiratorie acute a specifici agenti virali.
- Identificare possibili sottotipi virali e nuove varianti di virus respiratori.

Trasferibilità dei risultati

I dati relativi a questo sistema di sorveglianza eziologia, in corso di finanziamento da parte del CCM, possono essere di grande utilità in termini di sanità pubblica. Infatti, specie al di fuori del periodo del picco influenzale, non viene quasi mai effettuata la diagnosi eziologia delle cosiddette "sindromi influenzali". Identificare l'eziologia di tali sindromi e di eventuali focolai epidemici può aiutare la comprensione delle dinamiche epidemiche di singole infezioni virali e la implementazione di specifici interventi. Inoltre, il ritorno dell'informazione sulla diagnosi eziologia al medico o pediatra di base può favorire una scelta mirata della terapia. In conseguenza di ciò, il progetto potrebbe avere a medio o lungo termine delle positive ricadute sulla pratica clinica quotidiana, ivi compresa una migliore gestione dei trattamenti anti-infettivi.

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'augmentata 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.

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 a un incremento del numero di casi di malattia causata da virus cosiddetti "esotici", in particolare a 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 4 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 e 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.

L'ISS è l'unico laboratorio in Italia ad effettuare la diagnosi e la conferma di tali infezioni.

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.

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 l'OMS 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 dell'OMS, 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 OMS).

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 e eventualmente modificare le strategie di vaccinazione

Sorveglianza pilota delle infezioni gastroenteriche da *Rotavirus* nell'infanzia

Le infezioni da *Rotavirus* costituiscono un problema rilevante di sanità pubblica anche nei paesi industrializzati, come l'Italia, con elevati tassi di morbilità e costi sanitari. In particolare nell'infanzia, i *rotavirus* sono la principale causa di ricovero ospedaliero per diarrea acuta. La prossima introduzione di vaccini vivi attenuati in Europa e l'esistenza di un numero molto elevato di sierotipi virali (15G x 15P) rendono urgente la messa in atto di un sistema di sorveglianza sui casi di malattia e sulla circolazione e evoluzione dei ceppi di *Rotavirus*. Il progetto si propone di costituire una rete pilota di sorveglianza nazionale in Italia in grado di consentire la definizione di una *baseline* dei ceppi di rotavirus presenti prima dell'introduzione del vaccino, sulla quale sia possibile valutare successivamente l'impatto della vaccinazione sia sui ricoveri ospedalieri che sui sierotipi virali circolanti. A tale fine saranno coinvolte unità già collaboranti con il reparto ai fini della sorveglianza delle paralisi flaccide acute. Il progetto si propone anche di valutare la circolazione di diversi sierotipi di rotavirus nei paesi dell'area balcanica e dell'Europa dell'Est, collaboranti con il Centro di Referenza OMS sulla polio, presso l'ISS. Sarà monitorata la circolazione nell'area di ceppi eventualmente diversi da quelli italiani, valutando i possibili rischi di introduzione di nuovi sierotipi, anche successivamente all'introduzione della vaccinazione in Italia.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto consentirà di istituire una rete pilota di ospedali e laboratori di diagnostica virologica in diverse regioni d'Italia, in grado di effettuare stabilmente la raccolta dei casi di malattia e l'analisi diagnostica di primo livello. Verrà istituito presso l'ISS un *database* relativo ai casi sorvegliati e contenente i risultati sia delle analisi diagnostiche che di sierotipizzazione, queste ultime condotte principalmente presso l'ISS. Saranno sviluppati protocolli armonizzati, a livello nazionale e europeo, per la definizione di caso e per le tecniche di analisi di laboratorio, sia immunologiche che molecolari. La costituzione della rete, attraverso centri collaboranti in grado di condurre l'attività di sorveglianza per un periodo di diversi anni, consentirà di produrre dati utili ai fini della valutazione dell'efficacia della vaccinazione e della congruità della formula antigenica impiegata nei futuri vaccini. L'elaborazione dei dati della sorveglianza italiana e dell'Europa est-balcantica consentirà di determinare eventuali rischi di circolazione e introduzione nella popolazione di ceppi atipici, sulla base della sierotipizzazione G e P, sia prima che dopo l'introduzione della vaccinazione. I dati saranno anche utili a capire se e in che misura i prossimi vaccini monovalenti o polivalenti saranno in grado di esercitare un effetto di deriva evolutiva sul pool di *rotavirus* presenti oggi.

Trasferibilità dei risultati

I metodi di laboratorio, armonizzati a livello europeo, potranno essere trasmessi a laboratori periferici del SSN al fine di ottimizzare e standardizzare le procedure di diagnosi e di sierogenotipizzazione dei *rotavirus*. La partecipazione alla rete consentirà di sensibilizzare i centri partecipanti alle problematiche di sanità pubblica e di profilassi relativamente alle infezioni pediatriche da *rotavirus*. La costituzione di un *database* con i casi e le caratteristiche dei virus identificati permetterà a livello locale di comprendere eventuali spostamenti dell'epidemiologia di *rotavirus* entro e tra regioni italiane. I risultati dell'attività saranno resi disponibili alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni su riviste specializzate, convegni, *workshop*, linee guida.

Strategie di induzione di tolleranza nel trapianto d'organo mediante l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali

Nell'ambito della definizione di strategie per l'induzione di uno stato di tolleranza al trapianto di organi mediante impiego di cellule dendritiche modificate, è nostra intenzione studiare la capacità di agenti farmacologici (diltiazem) e di prodotti batterici (subunità B della tossina colerica) di agire su cellule dendritiche umane riducendone la maturazione e, di conseguenza, favorendo l'insorgenza di uno stato di tolleranza. Nostri studi precedenti hanno messo in evidenza una chiara azione di down-modulazione del diltiazem sulla differenziazione e sulla maturazione delle cellule dendritiche umane, riducendo, tra gli altri effetti, la produzione di IL-12. Lo scopo di questo progetto è quello di definire in maniera più completa l'interazione delle cellule dendritiche trattate con il farmaco e i linfociti T.

Recentemente sono stati avviati anche studi sull'attività della subunità B della tossina colerica (CTB) sulle cellule dendritiche umane, in considerazione di alcune evidenze sperimentali. È stata dimostrata, infatti, nel sistema murino, una diminuzione della produzione di IL-12 dopo somministrazione orale di tale subunità. Successivamente è stato dimostrato che la preincubazione di macrofagi umani con CT-B sopprime la risposta infiammatoria indotta da LPS con riduzione della produzione di citochine, tra cui l'IL-12. I nostri studi saranno volti ad esaminare l'espressione di molecole costimolatorie, la produzione di IL-10 e IL-12 e la capacità stimolatoria in MLR di cellule dendritiche umane pretrattate con CTB.

Risultati attesi nel triennio

Verranno intrapresi studi *in vitro* sull'effetto immunomodulante del diltiazem e della subunità B della tossina colerica sulle cellule dendritiche umane, in modo da definire la loro capacità nell'attenuare lo stato maturativo di tali cellule. Tale effetto potrebbe determinare l'induzione di cellule regolatorie, e che possono favorire uno stato di tolleranza.

Trasferibilità dei risultati

Definizione di nuovi strumenti terapeutici per il controllo della reazione di rigetto dell'organo nei trapianti e per il controllo delle fasi acute delle malattie autoimmuni.

Studi di epidemiologia molecolare e bioinformatica

Lo sviluppo delle biotecnologie negli ultimi venti anni ha consentito di elevare la moderna biologia a "*Big Science*" introducendo nei settori delle moderne scienze biologiche una nuova e esaltante branca di ricerca: la Bioinformatica

La bioinformatica inizia negli anni '70, insieme allo sviluppo delle tecnologie del DNA Ricombinante, e alle pubblicazioni delle prime sequenze di acidi nucleici, si inizia quindi a pensare a una programmazione dei grossi progetti di sequenziamento con il supporto di archivi informatici in cui immagazzinare questo tipo di dati per poi poterli analizzare.

Tra le principali funzioni della bioinformatica, importante è la progettazione, l'implementazione e l'applicazione di metodi matematici e statistici per la caratterizzazione funzionale delle sequenze geniche (DNA, RNA, Proteine) e per studi di evoluzione molecolare e strutturale degli acidi nucleici e delle proteine. La grande variabilità circa la proporzione stimata di sottotipi non-B di HIV-1 circolanti, nonché la variabilità e la continua evoluzione temporale del virus H5N1 dell'influenza aviaria e di altri tipi virali (epatite, *arbovirus*, ecc.) insieme alla grande disponibilità di sequenze di interi genomi o di interi segmenti genici che arricchiscono continuamente le banche dati, ci porta ad utilizzare queste metodologie di epidemiologia molecolare e bioinformatica per stimare la filogenesi e l'evoluzione temporale di molti tipi virali.

Risultati attesi nel triennio

Nei primi venti anni di epidemia l'infezione da HIV/AIDS ha avuto un impatto limitato nei paesi balcanici. La maggior parte dei paesi dell'Ovest dei Balcani negli anni recenti sono stati colpiti da una serie di avvenimenti catastrofici (guerre, distruzioni socio-economiche) che possono essere considerati dei potenziali determinanti della diffusione dell'infezione da HIV. a grande variabilità di questo virus e la diffusione dei vari sottotipi e delle forme ricombinanti, ha un ruolo importante per l'epidemiologia, la diagnosi, la terapia e la prevenzione dell'infezione.

Un primo obiettivo sarà la determinazione della diffusione e dell'evoluzione del virus HIV tra le popolazioni Balcaniche, proseguendo uno studio già finanziato su progetti AIDS.

Un secondo obiettivo sarà di descrivere l'evoluzione molecolare nel tempo del virus H5N1 dell'influenza aviaria mediante l'applicazione di metodologie *bayesiane*.

Un terzo obiettivo sarà la caratterizzazione filogenetica di tipi virali come gli *arbovirus* (virus Toscana) di interesse clinico, e di ricombinanti per i ceppi virali (es: epatite C) di cui non sono noti, nonché la caratterizzazione filogenetica e evolutiva di proteine di origine virale e batterica di particolare interesse. Studi molecolari sono importanti perché si possono condurre in siti candidati a sperimentazione vaccinale, inoltre la designazione di un sottotipo rappresenta un marcatore molecolare importante per seguire la diffusione del microrganismo.

Trasferibilità dei risultati

La conoscenza della distribuzione di tipi e sottotipi, e della loro circolazione in specifiche aree ha un impatto importante sull'epidemiologia, la diagnosi, il trattamento e la prevenzione delle infezioni associate. In particolare per quanto riguarda le infezioni da HIV, HCV e H5N1, la

determinazione della prevalenza, della circolazione delle forme ricombinanti e la conoscenza dell'evoluzione molecolare dei virus saranno di grande utilità nel campo della prevenzione per indirizzare nel modo migliore le eventuali strategie terapeutiche e vaccinali che possono essere utilizzate dagli operatori del Sistema Sanitario Nazionale.

Nell'ambito clinico sarà di grande utilità la conoscenza e l'individuazione delle *novel mutation* (analisi dei polimorfismi) in soggetti HIV positivi *naive* per terapia.

La diffusione dell'informazione per mezzo di pubblicazioni scientifiche internazionali sulla epidemiologia molecolare dei virus sarà di grande utilità alla comunità scientifica.

Studio comparativo dell'effetto adiuvante di IFN di tipo I nella preparazione di vaccini antivirali

L'uso di vaccini influenzali sempre più purificati, in grado di ridurre gli effetti collaterali, comporta una notevole riduzione del loro potere immunogenico. Studi recenti in modelli murini hanno dimostrato che l'interferon alfa/beta (IFN I) endogeno è necessario per l'induzione di una risposta immunitaria del tipo Th1 da parte degli adiuvanti vaccinali più comunemente usati. L'IFN I stesso, somministrato insieme ad un vaccino influenzale purificato, ha mostrato di avere un effetto adiuvante estremamente potente nel topo e di indurre una risposta protettiva contro l'infezione virale in tempi molto più rapidi rispetto al vaccino da solo.

L'attuale progetto di ricerca si pone la finalità di approfondire alcuni aspetti relativi ai meccanismi della attività regolatrice dell'IFN I sulla risposta immunitaria umorale e cellulare ad alcuni vaccini virali e di indicare nuove potenzialità applicative dell'uso di IFN I come adiuvante. Il progetto mira più in particolare a valutare la capacità di potenziamento della risposta immune di questa citochina in associazione con il vaccino influenzale.

Risultati attesi nel triennio

Gli elementi che si prevede verranno messi a disposizione dallo svolgimento di questo progetto investono diversi livelli di ricerca:

- Conoscenze di base: saranno fornite indicazioni su meccanismi che sottendono l'effetto adiuvante di interferon di tipo I e di alcuni adiuvanti di nuova generazione nella vaccinazione contro agenti virali.
- Conoscenze di tipo applicativo per il disegno di strategie di vaccinazione antivirale con particolare riferimento alla vaccinazione antinfluenzale.

Il lavoro svolto sarà possibilmente oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste a diffusione internazionale

Obiettivi intermedi

Dimostrazione dell'effetto adiuvante di interferon nella vaccinazione influenzale nel modello murino

Valutazione dei protocolli più efficaci per ottenere la migliore risposta vaccinale in modelli sperimentali murini

Valutazione della risposta anticorpale in soggetti sottoposti a trattamento con vaccino antiepatite B e interferon- α .

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto saranno resi disponibili a livello nazionale e internazionale, attraverso pubblicazioni scientifiche, partecipazioni a *workshop* e seminari.

Studio degli effetti di nuovi adiuvanti mucosali su linfociti b e cellule nk

I vaccini somministrati per via mucosale sono pratici, non invasivi ed efficaci nell'indurre risposte immuni sia mucosali che sistemiche. Vaccini mucosali formulati in modo appropriato

possono stimolare in modo diversificato le risposte del sistema immune e quindi possono essere utilizzati per indurre protezione contro vari patogeni che infettano l'ospite attraverso le mucose o altre vie. L'immunizzazione per via mucosale con antigeni purificati o ricombinanti necessita dell'uso di adiuvanti che amplifichino le risposte immuni. Un buon vaccino mucosale è in grado di indurre la produzione di anticorpi IgA antigene-specifici al sito di infezione, di IgG plasmatiche e di risposte cellulari specifiche anche a livello di siti diversi da quello di inoculo. È di estremo interesse quindi studiare nuovi adiuvanti mucosali e analizzarne il meccanismo di azione. Sono stati pubblicati diversi studi sugli effetti di adiuvanti mucosali sulle cellule presentanti l'antigene, quali monociti, macrofagi e cellule dendritiche. Poco si sa invece del loro effetto sui linfociti B e sulle cellule NK, che hanno un ruolo importante nell'attivazione della risposta immune a livello delle mucose, a causa delle loro interazioni con i linfociti T e le cellule dendritiche. In questo progetto ci proponiamo di analizzare *in vitro* gli effetti e i meccanismi d'azione di diversi adiuvanti mucosali, tra cui nuovi adiuvanti peptidici, su popolazioni di linfociti B (*naive, memory*) e di cellule NK, provenienti dalla milza e dal midollo osseo di topi Balb/c e C57Bl/6 *naive* e/o immunizzati con un antigene di interesse. Le varie sottopopolazioni saranno coltivate in presenza o in assenza degli adiuvanti mucosali e analizzate dal punto di vista fenotipico e funzionale.

Risultati attesi nel triennio

Ci aspettiamo che i diversi adiuvanti mucosali analizzati abbiano diversi effetti basati su altrettanti meccanismi d'azione. Infatti i recettori implicati e quindi la trasduzione del segnale saranno differenti. Alcuni adiuvanti saranno in grado di aumentare i secondi messaggeri, come cAMP o il Ca intracellulare, che determineranno, a seconda delle sottopopolazioni linfocitarie analizzate, effetti diversi, quali produzione di citochine, maturazione e attivazione, *switch* di anticorpi per i linfociti B, aumento o inibizione dell'attività citotossica per le cellule NK. Altri adiuvanti potrebbero interagire direttamente o indirettamente con i TLRs e quindi indurre un'attivazione della cellula trattata.

In base ai risultati ottenuti sarà quindi possibile prevedere il tipo di risposta immune indotta dai diversi adiuvanti e disegnare in modo appropriato esperimenti *in vivo* utilizzando modelli di infezione associati a differenti correlati di protezione.

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 dei meccanismi infiammatori e immunitari implicati nell'eziopatogenesi dell'aterosclerosi

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria cronica multifattoriale sotto il controllo del sistema immunitario ad eziopatogenesi non chiaramente definita. Evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato il ruolo della risposta immune verso antigeni *self* o *self* modificati nella patogenesi dell'aterosclerosi. In particolare le modificazioni proteiche dovute a glicazione e ossidazione potrebbero rendere antigeniche molecole endogene. Il mimetismo molecolare esistente tra agenti infettivi e molecole dell'ospite è una ulteriore possibile causa di fenomeni autoimmuni nell'aterosclerosi. Gli obiettivi della ricerca sono i seguenti:

1) Identificazione e caratterizzazione di antigeni *self* o *self* modificati in seguito a ossidazione e glicazione implicati in processi autoimmuni nell'aterosclerosi carotidea; messa in evidenza di eventuali fenomeni di mimetismo molecolare. 2) Studio dell'interazione degli autoantigeni con cellule del sistema immunitario, in particolare cellule dendritiche. 3) Identificazione e caratterizzazione delle popolazioni cellulari presenti all'interno della placca aterosclerotica; produzione di linee e cloni di linfociti T antigene-specifici a partire dai linfociti isolati dalla placca. 4) Identificazione di marcatori immunologici del danno vascolare nel sangue periferico dei pazienti con aterosclerosi carotidea.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso è l'individuazione di antigeni *self* o *self* modificati o di fenomeni di mimetismo molecolare implicati in processi autoimmuni nei pazienti con aterosclerosi carotidea. Un secondo 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. Verranno pertanto isolati e caratterizzati dal punto di vista fenotipico e funzionale i linfociti T presenti all'interno della lesione aterosclerotica e verranno prodotti cloni a partire da tali linfociti in risposta ad autoantigeni noti o neoidentificati. Un altro importante risultato sarà lo studio della interazione delle cellule dendritiche umane con gli autoantigeni identificati, la valutazione della loro capacità di orientare la risposta dei linfociti T specifici e la messa a punto di strategie di immunomodulazione in vitro delle cellule dendritiche per ottenere la tolleranza verso gli autoantigeni identificati.

Trasferibilità dei risultati

Una maggiore comprensione dei meccanismi immunologici coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi, con particolare riguardo alla identificazione di autoantigeni bersaglio di risposte immuni umorali e cellulari, potrebbe portare allo sviluppo di nuovi strumenti biologici di intervento preventivo e riparativo che interferiscano con i meccanismi putativi del danno vascolare. In particolare, l'utilizzo di cellule dendritiche tollerogeniche potrebbe costituire un valido strumento terapeutico in tale patologia.

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, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) 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 dall'OMS 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. L'OMS 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 immuno-deficienti, nei quali i poliovirus possono attecchire e permanere per lungo tempo nell'intestino creando potenziali *reservoirs* di virus.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto consentirà il consolidamento e lo sviluppo operativo della rete di sorveglianza delle AFP già operante in Italia dal 1997 e coordinata dall'ISS e dal Ministero della Salute, indispensabile al fine di controllare e contrastare il rischio di reintroduzione di poliovirus neurovirulenti, selvaggi o vaccino-derivati. A tali fini, verranno incrementate le attività di sorveglianza dei casi di AFP su base clinica, attraverso il coinvolgimento di medici dei reparti di neurologia, pediatria e malattie infettive. L'ISS effettuerà corsi di addestramento per operatori di laboratori virologici in grado di condurre indagini virologiche di primo livello sui casi di AFP. Verrà inoltre implementato il sistema di ricerca attiva e notifica dei casi di AFP. Saranno introdotte tecniche innovative per la caratterizzazione rapida dei ceppi di *poliovirus* e altri *enterovirus* in linea con gli sviluppi tecnologici in ambito OMS. Saranno acquisiti i risultati dell'isolamento e della caratterizzazione di polio e altri enterovirus per lo studio eziopatogenetico delle paralisi non-polio, in particolare le Guillain-Barré. Verrà infine estesa l'attività di ricerca di poliovirus nell'ambiente e lo studio *ad hoc* di soggetti con immunodeficienze, finalizzato all'individuazione di potenziali soggetti *long term excretors*.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso articoli scientifici, linee guida e documenti ufficiali, e saranno utilizzati per la richiesta di certificazione polio-free dell'Italia all'OMS. 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 l'OMS.

Studio della prevalenza della resistenza ai farmaci antitubercolari in ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* isolati da pazienti socialmente svantaggiati

Raccolta di ceppi isolati da pazienti appartenenti a gruppi a rischio (immigrati, pazienti senza fissa dimora) per la determinazione delle resistenze di *M.tuberculosis* ai farmaci antitubercolari di prima scelta (isoniazide, rifampicina, streptomina, etambutolo). Controllo di qualità da parte del *Supranational Reference Laboratory* del WHO presso l'ISS di cui sono responsabile nei confronti di un laboratorio che provvede a tale raccolta.

Risultati attesi nel triennio

I risultati di questo studio saranno un utile contributo per la stima dei tassi di resistenza ai farmaci antitubercolari di prima scelta in ceppi isolati in Italia da pazienti socialmente svantaggiati, rispetto alla popolazione generale. Questi risultati potranno essere trasferiti al Sistema Sanitario Nazionale attraverso congressi e incontri *ad hoc* con operatori sanitari.

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*

Studio della risposta cellulo-mediata nell'ambito della farmaco-vigilanza dell'efficacia della vaccinazione primaria contro malattie prevenibili

Il nostro Paese ha adottato la strategia vaccinale per l'infanzia basata su vaccini esavalenti che hanno contribuito ad aumentare grandemente la *compliance* nei confronti di tutte le vaccinazioni, e in particolare nei confronti delle vaccinazioni raccomandate. Questo comporta la necessità di una maggiore farmaco-vigilanza sull'efficacia vaccinale di ciascun componente. In quest'ottica, recentemente l'EMA ha verificato che un vaccino combinato per la prevenzione di 6 malattie (tetano, difterite, pertosse, poliomielite, infezioni invasive da *Hemophilus*

influenzae b e 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 anticorpale protettiva, il grado d'induzione di una risposta T specifica per i componenti vaccinali e in particolare per la componente dell'epatite. La risposta T della memoria è infatti indispensabile per il perdurare nel tempo di una adeguata risposta immunitaria protettiva.

Risultati attesi nel triennio

Date queste premesse, e sulla base anche dell'esperienza acquisita dal gruppo proponente (Cassone et al, 1997; Ausiello et al 1997; Ausiello et al, 1999;), lo studio prevede di ottenere il seguente risultato:

identificazione del saggio più adatto (in termini di specificità e di facilità di esecuzione) per la determinazione della risposta indotta dagli antigeni presenti nel vaccino esavalente e in particolare delle componenti dell'epatite, tenuto conto che i soggetti in studio sono inizialmente lattanti dai quali è possibile prelevare una piccola quantità di sangue.

Quindi per ottenere tale risultato il piano sperimentale proposto per lo studio dei parametri di risposta T è il seguente:

Scelta di un saggio per la valutazione della CMI da sangue intero stimolato con gli antigeni presenti nel vaccino. In un campione pilota, si confronteranno i saggi di risposta T da linfociti isolati con quelli ottenuti da sangue intero.

Identificazione di un saggio alternativo per l'identificazione delle T della memoria centrale e delle T della memoria effettrice.

Pianificazione dell'arruolamento dei soggetti nei quali si dovrà eseguire lo studio e definizione della dimensione del campione. Definizione di un progetto di studio/ricerca, anche se pilota su un campione limitato, ma sufficiente per gli obiettivi posti. Particolare attenzione dovrà essere posta alla logistica della raccolta dei campioni.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà 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. Le pubblicazioni dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstracts a congressi nazionali e internazionali, sono gli indicatori che si intende raggiungere.

Studio della struttura genetica di *Trichinella* e individuazione delle varianti alleliche per l'identificazione delle aree di provenienza degli animali infetti e studio del corredo proteomico di differenti specie di *Trichinella* per lo sviluppo di un test specie-specifico per la diagnosi della trichinellosi umana e animale

Identificazione della presenza e livello di variabilità genetica di *Trichinella* nell'area di distribuzione delle singole specie.

Individuazione di polimorfismi genetici mediante i) studio di polimorfismi dovuti a micro-minisatelliti varianti in dimensione; ii) analisi della presenza di polimorfismi AFLP; e iii) ricerca in *loci* specifici di varianti alleliche.

Identificazione di alleli specifici di aree geografiche di interesse per la trasmissione dell'infezione di *Trichinella*.

Sviluppo di un protocollo per la determinazione del *fingerprinting* genetico di un isolato per determinare la provenienza di carni infette.

Identificazione del corredo proteomico delle specie di *Trichinella* mediante elettroforesi bidimensionale.

Identificazione delle componenti proteiche specie-specifiche

Isolamento del gene codificante la proteina mediante lo screening di librerie genetiche di espressione di cDNA con antisieri poli-monoclonali

Sviluppo di un protocollo per un'immunodiagnosi specie-specifica

Risultati attesi nel triennio

Individuazione di varianti alleliche distribuite in modo discontinuo nell'areale di distribuzione delle specie di *Trichinella*, che svolgono il ruolo di "marcatori di provenienza".

Sviluppo di un protocollo di diagnosi su parassiti isolati da carni infette per l'individuazione dell'area di provenienza.

Individuazione di proteine peculiari di specie di *Trichinella* per lo sviluppo di un protocollo di immunodiagnosi specie-specifica.

Studio delle caratteristiche molecolari e biologiche di varianti di virus dell'epatite. Implicazioni eziologiche e patogenetiche

Le infezioni da virus dell'epatite sono causate da vari agenti eziologici. I virus epatitici si differenziano per caratteristiche genetiche (RNA, DNA) e replicative e sono pertanto classificati in famiglie virali filogeneticamente molto distanti. Presentano in comune le caratteristiche patogenetiche correlate allo spiccato epatotropismo, ivi incluso, per i virus che sono causa di infezione persistente (virus dell'epatite B (HBV), C (HCV), D (HDV)), lo sviluppo di infezione cronica, di cirrosi e di epatocarcinoma.

Nuovi virus sono stati recentemente caratterizzati quali: il virus dell'epatite E (HEV) associato ad episodi epidemici in Paesi in via di sviluppo e per cui tuttora sussistono problematiche di classificazione e i virus HGV e GB-C, TTV e SEN-V, che presentano differenti caratteristiche patogenetiche in parte tuttora da definire. Per tali virus può essere ipotizzata una distribuzione di varianti di cui solo alcune possono essere associate a patologia epatica.

La relativa frequenza di infezioni multiple, la possibilità di replicazione extraepatica, l'identificazione di varianti virali e di virus causa di infezioni occulte, ha portato nel campo dello studio delle infezioni da virus dell'epatite all'emergenza di nuove prospettive di ricerca per quanto concerne gli aspetti patogenetici e inoltre gli aspetti della prevenzione vaccinale e di applicazione di terapie specifiche oltre che nel settore della diagnosi.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto è incentrato sullo studio delle caratteristiche genetiche e della variabilità di virus dell'epatite di nuova o recente identificazione e delle loro varianti, al fine di stabilire un'esatta classificazione nell'ambito delle famiglie virali, di definire un possibile ruolo eziologico nell'ambito dei casi di epatite non definiti e di identificare possibili associazioni con particolari caratteristiche biologiche e/o patogenetiche.

Include la valutazione dell'ampio spettro di implicazioni conseguenti alla variabilità virale e relative sia all'emergenza di mutanti *escape* e di mutanti resistenti a terapia, sia le relative interazioni con le modificazioni della quasispecie e l'instaurarsi della cronicità nell'ospite. Il progetto si propone di utilizzare le metodiche di analisi filogenetica e tecniche di predizione delle variazioni strutturali delle proteine codificate.

Gli obiettivi specifici sono:

La standardizzazione e validazione di metodi di diagnostica molecolare e di analisi della variabilità virale nella valutazione degli esiti delle terapie antivirali.

Lo studio delle infezioni epatiche e extraepatiche di HCV: analisi della quasispecie virale in e ricerca di possibili associazioni tra varianti virali, genotipo, tropismo cellulare, patologia, risposta alla terapia.

La caratterizzazione genotipica e fenotipica di varianti virali anche in relazione ad episodi epidemici.

Lo studio degli aspetti virologici delle infezioni HBV-HCV; HCV-HIV; HBV-HDV.

Trasferibilità dei risultati

L'analisi delle varianti virali soprattutto in corso di infezioni ha importanti risvolti ai fini della profilassi, terapia e diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite.

La caratterizzazione delle mutazioni genomiche e della variabilità virale indotta, che possono avere importanza nell'insorgenza di fattori di resistenza alla terapia, e la caratterizzazione delle dinamiche con cui le popolazioni virali mutate evolvono nell'individuo sottoposto a terapia costituiscono dati che devono essere valutati e classificati a scopo prognostico.

Studio delle interazioni tra patogeni e cellule dell'immunità naturale che inducono l'espressione della cicloossigenasi II e la produzione di prostaglandina E2

Recentemente è stato dimostrato che alcuni patogeni (streptococchi di gruppo B, *Chlamydia pneumoniae*, *Candida albicans*) inducono in monociti-macrofagi l'espressione di cicloossigenasi II (COX-2), la isoforma inducibile dell'enzima COX che converte l'acido arachidonico in prostaglandina E2 (PGE2) e prostaciclina, suggerendo un ruolo importante del metabolismo degli eicosanoidi nella patogenesi di queste infezioni. È noto infatti che le prostaglandine modulano molti processi infiammatori e immunitari come la produzione di citochine, la proliferazione di linfociti T o la produzione di anticorpi. Inoltre è stata descritta la capacità di alcuni farmaci inibitori di COX-2 di inibire la crescita di alcuni patogeni. Obiettivi di questo progetto sono:

Studiare le interazioni tra componenti oligomannosidici e/o oligoglucosidici di *Chlamydia pneumoniae*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* e recettori di riconoscimento (PRR) espressi da monociti, macrofagi e cellule dendritiche responsabili dell'induzione di COX-2 e produzione di PGE2.

Valutare gli effetti della produzione di PGE2 sulla funzione di tali cellule infettate, come la capacità di uccidere un patogeno intracellulare o di presentare un antigene.

Valutare gli effetti di farmaci NSAID o di nuovi analoghi della vitamina D3, inibitori di COX-2, sulla crescita di questi patogeni.

Risultati attesi nel triennio

Induzione dell'espressione di COX-2 e produzione di PGE2 in seguito a interazione tra PAMPS contenenti mannosio o glucano e recettore del mannosio, CR3, DC-SIGN e TLRs.

Identificazione dei meccanismi molecolari attraverso i quali la PGE2 modula le funzioni effettrici dei macrofagi e cellule dendritiche.

Inibizione della crescita intracellulare di *Chlamydia pneumoniae* o di *Mycobacterium tuberculosis* e della trasformazione in ifa di lievito di *Candida albicans*

Trasferibilità dei risultati

Lo studio proposto può permettere l'individuazione di *target* terapeutici per bloccare il meccanismo patogenetico indotto dalla produzione di PGE2 in queste infezioni.

I risultati ottenuti possono porre le basi per un approccio terapeutico con nuovi farmaci inibitori di COX-2 nelle infezioni ad andamento cronico.

La diffusione dei risultati avverrà attraverso i canali *standard* come la pubblicazione su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di *abstract* a congressi nazionali e internazionali.

Studio delle risposta cellula mediata nell'ambito del progetto di sorveglianza dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* nelle Carceri Italiane

L'infezione causata dal *Mycobacterium tuberculosis* nell'uomo è stata dichiarata dal WHO come emergenza globale nel 1993 e ogni anno porta a morte 3 milioni di individui (Raviglione MC, et al 1995). Un fattore essenziale per il controllo e diffusione di questa malattia è la capacità di diagnosi nelle prime fasi dell'infezione, nonché la distinzione fra l'infezione latente e la malattia tubercolare.

L'infezione latente è diagnosticata da più di 100 anni utilizzando lo skin test per la tubercolina (soprattutto attraverso la *Mantoux*), tuttavia frequenti errori di somministrazione della proteina purificata derivata dalla tubercolina (PPD), nella lettura dei risultati, la *cross*-reattività con infezioni da altri micobatteri non-TB, il fenomeno del re-inoculo (Menzies R et al, 1994) e l'anergia tipica dei pazienti immunodepressi rende il *test* alla tubercolina di difficile interpretazione e fa sì che la sua specificità e sensibilità siano limitate (Huebner et al, 1993). Considerato che *Mycobacterium tuberculosis* è un patogeno intracellulare, la cui eliminazione è dipendente da un'efficace risposta T, è necessario identificare un *test* diagnostico per la tubercolosi (TB) basato sulla capacità di misurare una reattività T specifica. Studi recenti hanno dimostrato che è possibile differenziare lo stato latente d'infezione da quello d'infezione attiva (malattia) utilizzando come antigeni *target* per l'induzione specifica di IFN-gamma, rispettivamente la proteina intera ESAT6 e peptidi selezionati multiepitopici derivati da essa (Vincenti D et al 2003). L'uso di questi antigeni è anche in grado di monitorare l'efficacia della terapia anti-tubercolare (Carrara S, et al, 2004).

Risultati attesi nel triennio

Date queste premesse, e sulla base anche dell'esperienza acquisita dal gruppo proponente (Cassone et al, 1997; Ausiello et al 1997; Ausiello et al, 1999;), lo studio di sorveglianza prevede di:

Identificare il saggio più adatto (in termini di specificità e di facilità di esecuzione) per la determinazione della produzione di IFN-gamma indotto dagli antigeni tubercolari nella popolazione carceraria per valutare la prevalenza dell'infezione tubercolare latente e eventualmente attiva.

Validare questo saggio con quello attualmente in uso, i.e. *skin test* (*Mantoux*). È stato ormai già dimostrata in diversi studi la migliore *performance* del saggio del dosaggio dell'IFN-gamma indotto dal PPD o dalla proteina ESAT 6 intera rispetto allo *skin test* della tubercolina ().

Quindi il piano sperimentale proposto per lo studio dei parametri di risposta T è il seguente:

Scelta del saggio per la valutazione dell'IFN-gamma su sangue intero stimolato con antigeni in grado di individuare l'esposizione al *M. tuberculosis* (MT). Si confronteranno i saggi di risposta T da linfociti isolati con quelli ottenuti da sangue intero e in particolare con il nuovo saggio TB-gold (*celestis* approvato dall'FDA americana) e con il saggio da noi già a punto che utilizza un protocollo modificato da Hussain et al. (2002).

Pianificazione dell'arruolamento dei soggetti nei quali si dovrà eseguire lo studio e definizione della dimensione del campione. Definizione di un progetto di studio/ricerca, anche se pilota su un campione limitato, ma sufficiente per gli obiettivi posti, anche per le necessarie valutazioni e autorizzazioni preventive da parte del dipartimento dell'Amministrazione penitenziaria.

Particolare attenzione dovrà essere tributata alla logistica della raccolta dei campioni.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà l'individuazione di nuovi strumenti diagnostici particolarmente adatti per 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, permetterà di introdurre tali analisi in campioni di più vasta scala. 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.

Studio di campo sull'efficacia e sicurezza di un vaccino anti-Leishmania nel cane

Obiettivi generali e specifici:

Valutare l'efficacia e sicurezza di un preparato vaccinale anti-Leishmania nei cani mediante uno studio clinico randomizzato a doppio cieco che coinvolga animali di proprietà dell'età massima di 6 mesi, e 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 dalla frazione arricchita "Fucosio/Mannosio" di promastigoti di *Leishmania infantum*. Il prodotto, confezionato secondo GMP dalla *Fort Dodge Animal Health* con il nome di "Duramune Leishmania", verrà somministrato per 3 volte, a un mese di distanza, prima della stagione di trasmissione 2006. 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. 100) e di controllo (placebo) (n. 100). Periodicamente verranno effettuati esami sierologici (IFAT), parassitologici (microscopia e coltura) e molecolari (neste PCR).

Risultati attesi nel triennio

L'*outcome* del progetto sarà una accurata e rigorosa valutazione della protezione dall'infezione e/o dalla progressione della patologia nel cane a seguito della somministrazione di un prodotto vaccinale standardizzato e sicuro.

L'efficacia protettiva del vaccino è stata dimostrata in modelli murini. La risposta immunitaria del cane all'antigene vaccinale è stata eccellente in studi clinici di fase I. Tuttavia, l'esposizione naturale a molteplici stimoli infettanti potrebbe spostare la risposta immune verso un pattern non-protettivo, come già dimostrato in precedenti studi vaccinali per Leishmania nel cane.

Trasferibilità dei risultati

La ricerca e valutazione di vaccini anti-Leishmania per il serbatoio canino della leishmaniosi viscerale umana costituisce una priorità per il controllo della malattia in aree endemiche italiane.

Qualora risultasse efficace, il vaccino andrebbe a integrare le misure attualmente impiegate per il controllo della zoonosi, che presentano efficacia limitata (terapia dei soggetti infetti e controllo dei vettori).

Study and validation of underexplored molecular processes in Plasmodium as potential drug targets for new intervention strategies. Progetto ISS/NIH

Il progetto si propone di studiare un gruppo selezionato di proteine e/o *pathways* metabolici del plasmodio della malaria rilevanti od essenziali per la propagazione nell'ospite vertebrato o per la trasmissione all'insetto vettore, allo scopo di identificare nuove strategie di controllo della malattia. Il progetto si avvale della collaborazione del gruppo del Dr. Xin-zhuan Su al *National Institutes of Health* (NIH), e del Dr. J M. Carlton all'*Institute for Genomic Research* (TIGR). Il lavoro sperimentale è incentrato sullo studio di proteine specifiche dei gametociti, le forme responsabili della trasmissione del parassita e di enzimi coinvolti nel metabolismo del glutatione che ricopre un ruolo fondamentale nella protezione dal danno ossidativo. Saranno inoltre messi a punto approcci computazionali per l'identificazione di domini proteici a bassa complessità che caratterizzano un grande numero di proteine del parassita.

Risultati attesi nel triennio

Definizione di elementi che regolano la modulazione dell'espressione della g-GCS, enzima coinvolto nella biosintesi del glutatione. Ruolo della g-GCS nel meccanismo di resistenza alla cloroquina. Ruolo di proteine gametocita-specifiche nel differenziamento sessuale. Definizione di domini conservati all'interno di regioni a bassa complessità con un possibile ruolo strutturale e/o funzionale

Trasferibilità dei risultati

Generazione di linee transgeniche multicopie per il gene della g-GCS. Generazione di linee transgeniche che contengano geni gametocita-specifici inattivati. Sviluppo di strumenti bioinformatici per l'analisi di regioni a bassa complessità

Survey telefonica per lo studio delle caratteristiche psico-socio-comportamentali di un campione di utenti del Telefono Verde AIDS (TVA) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) non testati per HIV

In Italia la proporzione di persone che scopre di essere sieropositiva in fase avanzata di malattia supera il 50% dei casi di AIDS diagnosticati negli ultimi anni. Il non accesso al *test* HIV, quindi, la non conoscenza del proprio stato sierologico rappresenta un nodo critico per una precisa stima della prevalenza e dell'incidenza HIV.

Risulta evidente la necessità di conoscere le caratteristiche socio-anagrafiche, comportamentali e motivazionali di questo specifico *target*.

Il presente studio si propone di caratterizzare i soggetti che non effettuano il *test* HIV, allo scopo di contribuire a stimare la quota di persone sieropositive che, non testandosi, provocano una distorsione dei dati sulla diffusione del virus in Italia, riducendo le stime di prevalenza e di incidenza dell'infezione.

Risultati attesi nel triennio

Studiare le caratteristiche socio anagrafiche e comportamentali delle persone mai testate per l'HIV

Stimare la quota di queste persone rispetto alla popolazione generale

Valutare possibili correlazioni tra percezione del rischio e resistenza a sottoporsi al *test*.

Trasferibilità dei risultati

I risultati raggiunti dallo studio possono rappresentare una fase propedeutica indispensabile per attivare una seconda annualità del progetto mirata a stimare il numero di persone HIV positive che sfuggono alle indagini epidemiologiche e analizzare il loro impatto sulle stime nazionali di diffusione dell'infezione da HIV. Il proseguimento del progetto prevede un incrocio tra i dati di prevalenza e/o incidenza derivati da precedenti studi su specifiche sottopopolazioni (ad esempio gravide, ricoverati, donatori di sangue occasionali, soggetti con MST, ecc.) e la numerosità relativa delle persone che non si sono mai sottoposte al *test* anti-HIV rilevata dalla presente ricerca. Si potranno così anche rivedere le stime sul numero totale dei soggetti HIV positivi viventi in Italia.

Sviluppo di metodi e preparati di riferimento per la standardizzazione di prodotti immunologici

Da quando sono state recepite le Direttive Europee n. 89/342/EEC e n. 89/381/EEC, riguardanti le sostanze immunologiche, compresi allergeni e emoderivati, è risultata evidente la necessità di stabilire a livello europeo delle preparazioni di riferimento e di procedere alla standardizzazione di metodiche adeguate per il controllo di tali prodotti. Tale necessità nel caso degli allergeni è ancora più pressante a causa della difficoltà di caratterizzare i rispettivi estratti e della scarsità degli standard disponibili. L'adozione di metodiche e di *working standard* riconosciuti in tutta Europa, infatti, consente di evitare l'allestimento di *standard* nazionali con la conseguente eliminazione dei costi inerenti e evita alle autorità di controllo eventuali disaccordi nel mutuo riconoscimento. È una tendenza ormai consolidata che i laboratori di controllo utilizzino procedure standardizzate che hanno tra l'altro consentito la creazione di un *network* europeo nell'ambito di un Sistema di Assicurazione della Qualità. Su questa base e in sintonia con gli indirizzi europei, si ritiene di interesse istituzionale lo sviluppo di un progetto centrato sui seguenti prodotti immunologici: Allergeni: Preparazione e caratterizzazione di estratti allergenici di riferimento, e convalida delle metodiche impiegate. Citochine: Messa a punto e convalida delle metodiche vigenti nell'ambito della Farmacopea Europea, in particolare per quanto riguarda l'interferone alfa e gamma. Immunoglobuline: Convalida dei metodi per la misura dell'attività specifica, del potere anticomplementare, dell'integrità del frammento Fc e della distribuzione delle grandezze molecolari.

Risultati attesi nel triennio

Allergeni: 1) Preparazione di estratti allergenici rilevanti nell'area mediterranea. 2) Caratterizzazione degli estratti ottenuti. 3) Allestimento di preparazioni di riferimento. Sulla base dei risultati ottenuti nelle fasi precedenti si selezioneranno le preparazioni più consone per l'allestimento di preparazioni di riferimento che potranno essere oggetto di studi collaborativi in ambito nazionale ed europeo. Citochine: 1) Sviluppo e validazione di metodiche di Farmacopea Europea (Sezione 2.2.29; 2.2.31). 2) "Post-Marketing Surveillance" (European Department for the Quality of Medicines, EQM/Official Medicine Control Laboratories, OMCL). Immunoglobuline: Partecipazione ai seguenti studi collaborativi: 1) "Establishment of the Ph. Eur. BRP Human Immunoglobulin Batch 2. Phase II. (BSP044)". 2) "Proficiency Testing Study on ELISA of Human Hepatitis A Immunoglobulin (PTS012)". 3) Validazione di un saggio immunoenzimatico come alternativa al saggio *in vivo* dell'attività antitetanica.

Trasferibilità dei risultati

Le attività previste per la parte allergologica si sono focalizzate sull'estratto pollinico di *Olea europaea* mediante tre differenti saggi ELISA basati su anticorpi monoclonali. Gli analiti erano costituiti da sei diversi estratti allergenici. La convalida ha indicato che la specificità dei saggi è risultata buona per tutti i tre sistemi ELISA impiegati. La variabilità osservata risulta

accettabile. È stato anche standardizzato il metodo in HPLC per la valutazione dell'interferone. I risultati ottenuti mediante IEF, SDS-PAGE e HPLC applicate all'IFN-alpha 2 e l'IFN gamma-1b hanno indicato una buona messa a punto del metodo. Infine Ai fini di stabilire un 2° *Batch* della Preparazione Europea di Riferimento per l'Immuno-globulina Umana (Eur. Ph. BRP), durante lo studio tutti gli OMCL si doveva analizzare una preparazione allestita dallo EQM quale preparazione candidata per sostituire l'attuale Eur. Ph. BRP. I risultati hanno consentito di definire tale preparazione di riferimento in maniera appropriata.

Sviluppo di nuove strategie per la diagnosi, la profilassi e la terapia di infezioni da papillomavirus umano

Il progetto di ricerca si articola in varie linee di ricerca:

1) sviluppo di strategie vaccinali terapeutiche contro lesioni cancerose associate all'infezione da HPV basate sulle proteine oncogene virali E6 e E7;

2) controllo dell'infezione virale mediante anticorpi ricombinanti di tipo scFv diretti verso le oncoproteine dell'HPV16 espressi intracellularmente;

3) studio della risposta anticorpale verso le proteine virali.

1) Le proteine E6 e E7 di HPV ad alto rischio sono considerate antigeni tumore-specifici e *target* per vaccini terapeutici contro tumori HPV-associati. Nello sviluppo di un vaccino terapeutico saranno usati differenti sistemi di *delivery* delle proteine: estratto di pianta contenente E7, VLPs retro e/o lentivirali, microparticelle caricate con le due proteine, *baculovirus* ricombinanti. Ognuno di questi sistemi sarà valutato per la capacità di incorporare le proteine e preparazioni "vaccinali" basate su di essi saranno valutate per loro efficacia anti-tumorale in un modello murino e nel modello "pre-clinico" costituito da cellule dendritiche umane.

2) Anticorpi scFv specifici per le oncoproteine E7 e E6, selezionati mediante la tecnologia *phage display*, saranno espressi in cellule HPV+ per studiarne l'efficacia nel bloccare i meccanismi di oncogenesi associati a queste proteine.

3) Sviluppo di un sistema ELISA *multiplex* per la valutazione della risposta anticorpale verso il proteoma virale e suo possibile uso nella diagnosi dell'infezione virale.

Risultati attesi nel triennio

1) Nel triennio saranno messi a punto le preparazioni vaccinali e i protocolli di vaccinazione e sarà valutata la loro efficacia antitumorale in topo. Saranno studiate sia la risposta immunitaria cellulo-mediata che la risposta anticorpale indotte dalla vaccinazione e saggiate varie vie di inoculazione rispetto a quella sottocutanea. Sarà valutato l'effetto dell'immunogeno in presenza di adiuvanti. Sarà anche valutata la capacità delle preparazioni vaccinali di indurre una risposta citotossica quando caricate su DCs umane.

2) I scFv anti-E7/E6 saranno caratterizzati per struttura primaria e secondaria, reattività e specificità in sistemi *in vitro*. Saranno quindi espressi nei diversi compartimenti cellulari e ne saranno valutate la capacità di legare l'antigene, la stabilità e l'interferenza con il processo di oncogenesi virale in cellule HPV+. Dai risultati sarà valutata la possibilità di usarli in un sistema *in vivo*.

3) La maggior parte dei sistemi per il rilevamento di anticorpi contro l'infezione da HPV è basata su una o due proteine virali. Per ottenere una aumentata sensibilità sarà sviluppato un sistema ELISA possibilmente basato su tutte le proteine virali prodotte in sistemi procariotici. Le proteine saranno quelle di HPV16, responsabile per il 50% dei tumori cervicali, usate in forma denaturata per valutare la possibilità di rilevare anticorpi diretti contro proteine di altri tipi virali, data la loro alta omologia primaria.

Trasferibilità dei risultati

Le finalità del progetto sono la messa a punto di sistemi terapeutici contro il tumore associato a HPV e di un sistema diagnostico da affiancare ai sistemi di prevenzione del cancro HPV-correlato già esistenti, *Pap-test* e *HPV-DNA-test*.

La necessità di sviluppare un vaccino antitumorale è una priorità sentita nella comunità scientifica.

Il successo del progetto potrà tradursi nella disponibilità di un preparato vaccinale valutato in sistema animale e su DCs, che potrà essere ulteriormente sviluppato.

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.

La valutazione della risposta anticorpale e la sua correlazione con la patologia rivestono un ruolo importante nelle malattie infettive. Per l'infezione da HPV non si dispone di sistemi di rilevazione sensibili per cui un sistema semplice, non costoso e sensibile come quello proposto sarebbe di particolare utilità.

The role of transcription factors of the IRF family, IRF-1 and IRF-8, in the generation of Dendritic cells-mediated tumor immunity: novel approaches to cancer therapy

L'obiettivo principale del progetto è determinare se l'espressione costitutiva nelle cellule Dendritiche dei fattori di trascrizione IRF-1 e IRF-8, implicati nel *signaling* degli Interferoni, porti a una maggiore capacità di presentare l'antigene da parte delle APC e evocchi una più duratura risposta T e B. Le cellule dendritiche sono componenti essenziali della risposta immune in quanto inducono e controllano la risposta T specifica e modulano l'attività sia delle cellule NK che dei linfociti B. Recentemente sono state considerate anche promettenti strumenti terapeutici per la vaccinazione e l'immunoterapia di diverse patologie quali i tumori, le infezioni virali croniche, l'autoimmunità e le allergie. In questo contesto cellule dendritiche isolate e caricate *ex vivo* con antigeni specifici e risomministrate hanno dimostrato, in modelli sperimentali, di indurre un'immunità protettiva e diversi *clinical trial* pilota sono già in corso nell'uomo. La manipolazione e la programmazione di tali cellule rappresenta un valido strumento per generare cellule dendritiche del fenotipo desiderato e modulare la loro attività. In particolare è stato visto che la funzionalità delle cellule dendritiche è notevolmente aumentata se assieme all'antigene di interesse esse esprimono anche fattori immunomodulatori quali citochine e molecole costimolatorie. Tra le citochine gli Interferoni sono potenti immunomodulatori che esplicano le loro funzioni attraverso la stimolazione di almeno 300 geni. Tra questi, IRF-1 e IRF-8 sono due fattori di trascrizione in grado a loro volta di modulare diverse funzioni cellulari tra cui il fenotipo e l'attività anche delle cellule dendritiche. Su tale base entrambi questi fattori possono costituire dei potenti adiuvanti per la formulazione sia di vaccini antitumorali che antinfettivi.

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
funzionalità delle cellule ingegnerizzate

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 sia tumorali che di organismi patogeni

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 ottimizzare l'attività immunostimolatoria di tali cellule ingegnerizzandole con due fattori di trascrizione con potente attività immunomodulatoria. Gli studi sulla funzionalità *in vitro* e *in vivo* in modelli sperimentali murini di IRF-1 e IRF-8 costituisce la necessaria evidenza sperimentale per il loro uso e/o la modulazione della loro espressione con RNA interferenti, come adiuvanti nell'evocare una duratura risposta immune contro diversi antigeni.

Tossine batteriche e molecole endogene come adiuvanti per vaccini mucosali: effetti *in vivo* e *in vitro* su cellule del sistema immunitario

Da diversi anni ci occupiamo di identificare e di caratterizzare l'attività di adiuvanti per vaccini mucosali. Infatti l'uso di adiuvanti per la formulazione di vaccini basati su antigeni solubili richiede l'utilizzo di sostanze che amplifichino e eventualmente modulino la risposta immunitaria. Tali sostanze devono essere efficaci e prive di tossicità. Ad oggi non sono stati autorizzati adiuvanti mucosali per uso umano. I problemi principali in questo campo sono la relazione inversa spesso presente tra efficacia e tossicità e il fatto che il meccanismo d'azione degli adiuvanti più efficaci è finora poco compreso. C'è quindi bisogno di capire i meccanismi chiave dell'adiuvanza e dell'immunomodulazione in seguito a vaccinazione mucosale. Ciò permetterà di disegnare adiuvanti *ad hoc* che siano privi di effetti tossici. Un secondo aspetto del nostro lavoro sugli adiuvanti è quello di identificare e caratterizzare molecole semplici e con attività nota che agiscano da adiuvanti mucosali. Nell'ultimo anno abbiamo brevettato due peptidi con attività adiuvante, uno di origine microbica e uno di origine endogena. Lo scopo di questo progetto è quello di caratterizzare questi adiuvanti per la loro efficacia in diversi modelli murini di vaccinazione contro malattie infettive e contro neoplasie. Inoltre, gli effetti dei due nuovi adiuvanti e di adiuvanti già noti ad alta efficacia (come la tossina colerica) saranno studiati *in vitro*, su cellule murine e umane, quali cellule presentanti l'antigene, linfociti, cellule epiteliali e altre cellule dell'immunità innata, allo scopo di capire in dettaglio la loro interazione con il sistema immunitario dell'ospite.

Risultati attesi nel triennio

I risultati di tale progetto faranno luce sui requisiti dell'adiuvanza a livello mucosale, nei diversi *step* di interazione con le cellule dell'ospite. Lo studio della loro efficacia in modelli murini di infezione e neoplasia offrirà dei modelli preclinici per lo sviluppo di vaccini mucosali contro queste malattie. La caratterizzazione dei due peptidi adiuvanti può fornire due sostanze assolutamente nuove nella loro natura e attività (sono i primi peptidi con attività di adiuvanti mucosali finora descritti) che potrebbero essere sviluppate per la formulazione di vaccini per uso umano. Gli adiuvanti peptidici offrono diversi vantaggi tra cui quello di potere essere ottenuti sinteticamente e essere quindi privi di LPS, un contaminante tossico di molti vaccini.

Trasferibilità dei risultati

La comprensione dei meccanismi dell'adiuvanza mucosale offrirà alla Comunità Scientifica le basi per poter disegnare adiuvanti più efficaci e meno tossici. Inoltre gli adiuvanti peptidici, opportunamente sviluppati, potranno essere testati in trials clinici con vaccini mucosali. I risultati dei nostri studi saranno pubblicati su riviste internazionali e porranno le basi per ulteriori collaborazioni in ambito accademico e industriale.

Tubercolosi: nuovi approcci terapeutici e vaccinali

Le cause della riemergenza della TB sono ascrivibili a *M.tuberculosis* (Mtb) multiresistente ai farmaci (ceppi MDR), scarsa protezione del vaccino BCG, persistenza di Mtb in forma “dormiente” (TB latente). La TB latente non viene risolta dal trattamento profilattico; per questo motivo verrà studiato l’effetto di farmaci attivi verso Mtb dormiente ottenuto in colture ipossiche. Si studierà l’attività anti-TB di antibiotici attivi verso i batteri anaerobi (nitroimidazoli), anche in combinazione con altri farmaci, sia verso stipiti di collezione che in ceppi MDR isolati da pazienti con TB cronica; le combinazioni migliori verranno saggiate in un modello di TB latente nell’animale. Per contribuire al problema MDR saranno proseguiti gli studi sui farmaci antitubercolari di seconda linea. Riguardo ai vaccini, continueranno i saggi nel topo sull’attività di vaccini a DNA codificanti per la proteina 85B o per altri antigeni precoci di Mtb, e per proteine della dormienza (ad es. a-cristallina). Gli animali saranno immunizzati per varie vie con differenti *prime-boost* vaccinali (DNA-proteina, BCG-DNA, BCG-proteina) e ne verrà determinata la risposta immunitaria e la protezione verso Mtb. L’espressione genica di proteine precoci e della dormienza nei topi vaccinati sarà valutata mediante *real-time* PCR. Saranno altresì proseguiti gli studi sugli adiuvanti (ad es. tossina detossificata della pertosse) e sui meccanismi immunitari che interferiscono sulla protezione indotta dai vaccini a DNA.

Risultati attesi nel triennio

Il modello di dormienza *in vitro* di Wayne verrà usato per determinare l’inibizione della crescita di Mtb da parte di combinazioni contenenti nitroimidazoli (metronidazolo, tinidazolo), o altri farmaci per anaerobi, e farmaci anti-TB. L’attività delle combinazioni migliori verrà saggiata in topi (modello di Cornell) o cavie con TB latente. In prospettiva, tali studi saranno utili per determinare l’effetto sterilizzante di tali combinazioni nei pazienti PPD(+) infettati con Mtb sensibili ai farmaci e MDR. Le conoscenze sulla risposta immunitaria verso le proteine della dormienza (PdD) di Mtb sono scarse, così come il loro uso in campo vaccinale per “boostare” la risposta indotta da proteine precoci (PP) o da BCG, che non elimina la sacca di Mtb dormienti (1-10% nei modelli animali). L’uso combinato nel modello vaccinale murino di PP o BCG e PdD potrebbe impedire a Mtb sia di replicarsi che di andare in dormienza dopo l’infezione iniziale, producendo utili indicazioni per l’eradicazione della TB latente. Nell’uomo, la risposta immunitaria verso le PP e le PdD verrà studiata in pazienti con differenti fasi di infezione e malattia come *test* diagnostico per discriminare TB attiva da latente. La caratterizzazione della risposta immunitaria alle PP (85B e altre proteine) nel topo potrà essere di utilità sia per capire alcuni aspetti dell’immunopatologia della TB che per pianificare nuove formulazioni vaccinali da usare con varie modalità di somministrazione (parenterale e mucosale).

Trasferibilità dei risultati

Risultati promettenti *in vitro* e *in vivo* da parte di nuove combinazioni di farmaci attivi su Mtb dormiente potrebbero venire utilmente impiegati per la profilassi dei pazienti tubercolino-positivi e/o a rischio di riattivazione della TB. L’identificazione di nuovi adiuvanti e di meccanismi immunitari in grado di aumentare l’attività protettiva dei vaccini antitubercolari è utile per lo studio di nuovi vaccini verso la TB. I risultati di queste ricerche verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso seminari, congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*.

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, con picchi di incidenza ricorrenti anche in paesi con ampia copertura vaccinale. L'ampia diffusione della malattia è spiegata dal progressivo diminuire dell'immunità indotta dalla vaccinazione e dalla comparsa di nuove varianti batteriche. I meccanismi immunitari che mediano la protezione conferita dai vaccini anti-pertosse non sono stati ancora chiariti né i correlati di protezione identificati. È necessario quindi avere una migliore comprensione delle basi immunologiche della risposta verso *B. pertussis*. È importante infatti 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. Si utilizzeranno quindi varianti batteriche prive dei diversi fattori di virulenza e/o gli stessi fattori purificati, sia attivi che eventualmente inattivati geneticamente.

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. L'interazione tra DC umane e *B. pertussis* sarà analizzata mediante un modello di infezione *ex vivo*. Parallelamente agli studi sulle DC, intendiamo sviluppare nuovi saggi per misurare la risposta immunitaria indotta dai fattori di virulenza, inseriti e/o eventualmente da inserire nei vaccini, in termini di risposta anticorpale e di risposta T, identificando la presenza di cellule della memoria centrale e di quella effettrice.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo principale è l'analisi della risposta immunitaria indotta da *B. pertussis* e dai suoi fattori di virulenza. In dettaglio si intende:

Stabilire se il batterio, isolati clinici che presentano polimorfismi nei fattori di virulenza, e i singoli fattori di virulenza purificati siano in grado di indurre la transizione fenotipica e funzionale delle DC e nel promuovere risposte protettive di tipo cellulare (Th-1) o umorale (Th-2) o, al contrario, risposte di tipo regolatorio che permettano al batterio di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite.

Analizzare la capacità dei diversi fattori di virulenza del batterio di esercitare effetti positivi o negativi sull'immunità anti-pertosse e se i polimorfismi riscontrati negli isolati clinici siano effettivamente responsabili di una diminuita efficacia vaccinale.

Analizzare l'espressione di specifici recettori di membrana e la produzione di citochine immunoregolatriche, per definirne meglio il loro contributo al tipo di risposta immunitaria che si evidenzierà.

Sviluppare saggi *in vitro* su sangue intero con lo scopo di avere a disposizione una metodica semplice che richieda limitate quantità di sangue prelevato dai pazienti, utilizzabile quindi anche nei neonati, che permetta di meglio definire i correlati di protezione verso la pertosse.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà l'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.

Sarà possibile inoltre stabilire se isolati batterici con polimorfismi nei fattori di virulenza inducono risposte immunitarie differenti responsabili di una minore efficacia dei vaccini attualmente in uso.

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.

Un test sierologico per stimare l'incidenza delle infezioni da HIV

Nella maggior parte dei soggetti HIV-positivi non è possibile stabilire la durata dell'infezione poiché disponiamo al momento attuale solo di strumenti che ne consentono unicamente una stima approssimativa, alcuni dei quali possono essere impiegati soltanto su sangue fresco. Sarebbe, viceversa, auspicabile disporre di un metodo semplice e rapido, possibilmente applicabile anche su siero, per distinguere le infezioni recenti da quelle di vecchia data, sia ai fini clinici e prognostici, che ai fini epidemiologici per monitorare meglio la diffusione del virus nella popolazione.

A questo proposito, il nostro gruppo ha messo a punto un test sierologico capace di identificare le infezioni recenti da HIV sulla base dell'indice di avidità degli anticorpi anti-HIV. Il *test*, che viene effettuato in automatico con un *kit* commerciale, è poco costoso, semplice da eseguire e ha mostrato elevati livelli di sensibilità e specificità nell'identificare soggetti italiani sieroconvertiti per HIV negli ultimi 6 mesi.

Si intende stimare l'incidenza dell'infezione da HIV in diverse aree italiane attraverso l'uso di tale *test*, valutare la robustezza del *test* in Paesi in via di sviluppo, dove sono maggiormente diffusi sottotipi di HIV diversi da quelli presenti nel nostro Paese, studiarne l'applicazione in bambini nati da madre HIV+, e confrontare l'indice di avidità con altri test sierologici per l'identificazione delle infezioni recenti, attualmente in studio in altri paesi.

Risultati attesi nel triennio

Valutare la robustezza del test in soggetti HIV-infetti con sottotipi non-B

Stimare l'incidenza di infezione da HIV in soggetti della popolazione generale, secondo le diverse aree geografiche (regioni, province) e altre variabili di interesse

Estrapolare stime di incidenza HIV a livello nazionale

Includere il *test* dell'avidità anticorpale per HIV come *test* di routine in tutti i sistemi di sorveglianza dell'infezione da HIV.

Applicare il *test* nell'identificazione dei bambini nati da madre HIV positiva che hanno acquisito l'infezione per via verticale.

Definire il *test* più appropriato e affidabile per identificare le infezioni recenti da HIV, tra quelli attualmente in studio, in base alla semplicità di esecuzione, riproducibilità, robustezza e costi.

Trasferibilità dei risultati

Integrare le informazioni provenienti dai sistemi di sorveglianza per HIV con veri dati di incidenza dell'infezione,

descrivere le modificazioni in atto nell'epidemia HIV,

fornire gli strumenti necessari a pianificare interventi di prevenzione primaria e secondaria,

standardizzare e facilitare l'effettuazione del test di avidità per HIV a tutti i laboratori che effettuano *test* HIV a livello nazionale

implementare il test in nazioni in via di sviluppo per effettuare stime di incidenza locali.

Uso di derivati batterici nella induzione e espansione di cellule T regolatorie mucosali

Recentemente sono state evidenziate proprietà immunomodulanti di alcune tossine, tra le quali la tossina colerica. La somministrazione di queste tossine, o loro derivati non tossici sembra essere in grado di influenzare il decorso di malattia in modelli animali di malattie autoimmuni. Uno dei problemi ancora aperti nella terapia del morbo di Crohn, è la prevenzione delle riacutizzazioni che fatalmente seguono a periodi di benessere più o meno prolungati. Nessun farmaco, tra quelli in uso (ad eccezione degli immunosoppressori), si è rivelato in grado di prevenire le riacutizzazioni. Recenti evidenze suggeriscono che, in questi pazienti, esista a livello intestinale un'espansione di cellule regolatorie insufficiente a controllare l'infiammazione. Il progetto ha lo scopo di valutare la capacità di CT-B e/o CT di indurre e 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).

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si articolerà come segue: a) studio *in vitro* delle capacità immunomodulanti di CT-B su cellule dendritiche; b) valutazione della capacità di cellule dendritiche pretrattate con CTB, di indurre cellule T regolatorie; c) studio *in vitro* della capacità di CT di espandere cellule regolatorie. I risultati ottenuti in a) b) e c) saranno validati in un modello murino di colite ricorrente mediante somministrazione orale di CT-B nella fase di quiescenza della colite o mediante trasferimento adottivo di cellule T regolatorie espanse mediante incubazione con CT. I risultati dovrebbero ulteriormente definire l'attività immunomodulatoria dei derivati batterici in studio. In particolare la capacità di agire su cellule dendritiche e di indurre cellule T regolatorie.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di nuovi strumenti terapeutici per il controllo delle riacutizzazioni cliniche e/o della recidiva post-chirurgica del morbo di Crohn.

Validazione sul campo di un vaccino anti-*Echinococcus granulosus*

L'echinococcosi cistica è l'infezione da elminti più importante per numero di casi umani, gravità e costo economico presente in Italia (circa 800 casi ospedalizzati per l'asportazione chirurgica di cisti idatidee/anno). Recentemente è stato sviluppato un vaccino ricombinante, denominato EG95r, che protegge l'ospite intermedio (la pecora) dall'infezione per ingestione delle uova eliminate dal cane. Il presente progetto è il primo in Italia di vaccinazione verso un agente eziologico di origine parassitaria a trasmissione zoonotica. Il progetto si prefigge di valutare sul campo l'efficacia del vaccino EG95r negli ovicapri della provincia di Matera. I tempi necessari allo sviluppo del parassita impongono che il progetto copra un lasso di tempo non inferiore ai tre anni. In accordo con le autorità sanitarie della regione Basilicata, le USL, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, e l'Associazione allevatori sono stati già arruolati greggi di ovicapri per un totale di circa 12.000 capi di 34 allevamenti. In ogni allevamento il 50% degli animali, suddivisi per classi di età, sono stati vaccinati due volte a distanza di tre mesi, il restante 50% rappresenta il controllo. Ogni anno si provvederà ad un richiamo vaccinale per gli animali già vaccinati e alle due vaccinazioni per le nuove rimonte. Tutti gli animali presenti in ogni allevamento (vaccinati e non vaccinati) macellati o morti per cause naturali negli allevamenti saranno monitorati per la presenza di cisti idatidee, numero, localizzazione e fertilità.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dell'efficacia protettive del vaccino ricombinante EG95r nei confronti dello stadio larvale di *Echinococcus granulosus* nell'ospite intermedio;
valutazione dell'impiego del vaccino nella realtà zootecnica italiana

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti al termine del progetto saranno oggetto di una relazione tecnico-scientifica che verrà trasmessa alle competenti autorità sanitarie della Regione Basilicata che finanziano il progetto e agli altri enti che collaborano al progetto stesso. Al contempo saranno oggetto di relazioni a congressi e pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Poiché la causa primaria della trasmissione dell'infezione deriva dalla macellazione clandestina, si provverà nell'ambito del progetto ad organizzare uno o più incontri con medici, medici veterinari e allevatori per aggiornarli sul problema dell'echinococcosi cistica e sul progetto di ricerca in atto nel territorio della Regione Basilicata.

Valutazione della contaminazione da Legionella e analisi del rischio di esposizione per i lavoratori Telecom Italia nei manufatti sotterranei Telecom

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 elevate, variabili tra 9000 e 940000 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. Questo studio permetterà di valutare oggettivamente il rischio, al fine di prescrivere idonee misure di prevenzione per i lavoratori del settore. Sarebbe altresì interessante conoscere il livello di esposizione nei confronti di Legionella in un campione rappresentativo del personale che svolge la propria attività lavorativa nei manufatti sotterranei, attraverso la determinazione del titolo degli anticorpi anti-legionella, rispetto a un equivalente gruppo di popolazione preso come controllo

Risultati attesi nel triennio

Determinazione del livello di contaminazione da Legionella dei manufatti sotterranei Telecom attraverso il campionamento nel periodo estivo-autunnale, di un numero significativo di tali strutture situate nella regione Piemonte;

Determinazione del livello di esposizione a Legionella in un campione rappresentativo del personale che svolge la propria attività lavorativa nei manufatti sotterranei.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni potranno essere indicate nella prossima revisione delle "Linee guida per il controllo e la prevenzione della legionellosi" e essere oggetto di pubblicazioni scientifiche a carattere internazionale.

Valutazione di metodi molecolari rapidi per la diagnostica microbiologica della tubercolosi farmacoresistente

A causa dell'isolamento sempre più frequente di ceppi di *M.tuberculosis* (Mtb) resistenti ai fluorochinoloni (FQ), questo studio si pone come obiettivo la raccolta e la caratterizzazione fenotipica e molecolare della resistenza a questi farmaci in ceppi di Mtb isolati in Italia e in Abkhazia, una regione dell'ex Unione Sovietica sulle coste del Mar Nero ad alta endemia tubercolare, mediante determinazione delle concentrazioni minime inibenti la crescita (MIC) e il

sequenziamento del gene *gyrA*, il gene bersaglio dei FQ. Si cercherà inoltre di mettere a punto un *test* molecolare rapido per la determinazione della resistenza di Mtb a questi farmaci basato sulla determinazione delle mutazioni intervenute nel gene *gyrA* sia in isolati clinici che nell'espettorato di pazienti affetti da tubercolosi.

Risultati attesi nel triennio

Allestimento di una ceppoteca costituita da ceppi di Mtb con vari livelli di resistenza a vari FQ fra cui ofloxacina, ciprofloxacina, sparfloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina isolati da pazienti italiani (Progetto SMIRA) e dell'Abkhazia, in collaborazione con Medici Senza Frontiere. Determinazione delle MIC dei ceppi isolati e correlazione della resistenza con le mutazioni intervenute nel gene *gyrA* e/o con altri meccanismi molecolari quali le pompe di efflusso di Mtb ai FQ.

Messa a punto di un test di ibridazione inversa su strisce di nitrocellulosa per la determinazione rapida della resistenza di Mtb ai FQ. Tale informazione è di particolare rilevanza soprattutto per i ceppi *multidrug-resistant* (MDR) di MTB, ovvero resistenti ai due farmaci antitubercolari maggiori, isoniazide e rifampicina, i quali a seguito della successiva terapia con i fluorochinoloni sviluppano resistenza anche a queste molecole.

Trasferibilità dei risultati

L'allestimento di una collezione di ceppi di Mtb resistenti ai FQ in ISS costituita in gran parte da ceppi MDR, è utile come banca microbiologica da utilizzare anche per lo studio della resistenza verso altri farmaci antitubercolari.

Un test molecolare per la diagnosi rapida (1 giorno) di resistenza di Mtb ai FQ non esiste in commercio e potrebbe essere utilmente impiegato nei laboratori di batteriologia della tubercolosi.

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 6 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, del 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 5 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'areale. 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

dai 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 *markers* molecolari informativi per studi di popolazioni anofeliche

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità al 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

I virus influenzali ricombinanti, quali vettori di antigeni modello o polipeptidi correlati ad HIV-1 o ad altri agenti infettivi in modelli di infezione murina, costituiscono uno strumento di studio particolarmente utile per approfondire problematiche generali connesse allo sviluppo di vettori virali e prodotti derivati, come "*virus like particles*" o virusomi, quali possibili immunogeni per il *delivery* di antigeni e per definire nuove strategie di vaccinazione e protocolli di immunizzazione con sostanze adiuvanti e modulatrici della risposta immune. Inoltre, recenti studi da noi intrapresi sono mirati ad estendere l'analisi sulla efficacia del virus influenzale nell'indurre una risposta immune attraverso infezione per la via vaginale rispetto alla via respiratoria, con particolare riferimento al relativo *cross-talk* tra i due compartimenti mucosali. Tali studi assumono una particolare valenza nella relazione funzionale tra vie e forme di somministrazione di preparati vaccinali e la corrispondenza con i siti di infezione e la presenza locale di effettori della risposta immune. La comprensione dei fattori che condizionano il reclutamento di cellule effettrici nella fase acuta di una infezione secondaria e il mantenimento di cellule memoria nei diversi tessuti è di rilevante interesse ai fini di possibili strategie vaccinali anche in considerazione della diversa natura degli immunogeni.

Risultati attesi nel triennio

Una migliore conoscenza dei fenomeni di homing e condizioni ottimali di *priming*, analizzata in relazione alla natura degli antigeni, distribuzione tissutale, cinetiche di comparsa e ampiezza di popolazioni effettrici antigene specifiche richiamate in seguito ad infezione secondaria con virus ricombinanti di topi immunizzati, in presenza o meno di fattori modulanti la presentazione antigenica, può contribuire a ricadute di interesse pratico. Da tali studi potranno in particolare delinearsi conoscenze a sostegno di possibili strategie favorevoli la risposta cellulo-mediata associata alla somministrazione di virus influenzali inattivati al calore o con sostanze chimiche attualmente impiegate nelle preparazioni vaccinali. L'impiego di differenti forme di antigene, associate o meno a sostanze adiuvanti o ad infezione virale, vuole altresì stabilire il ruolo della risposta infiammatoria in questi fenomeni e come la diversa natura o forma di presentazione di tali antigeni nei moduli e possibilmente nei migliori le proprietà immunogeniche. Virus influenzali ricombinanti in grado di veicolare antigeni di HIV-1 nei geni

NA e/o NS1 verranno inoltre utilizzati nell'analisi della risposta immune verso gli antigeni veicolati in relazione agli schemi di studio sopra richiamati. Tali studi sono anche direttamente finalizzati a valutare il possibile impiego di virus influenzali ricombinanti nel veicolare antigeni di HIV-1.

Trasferibilità dei risultati

L'attività di ricerca sopra descritta è centrata su tematiche rilevanti nella valorizzazione e impiego di prodotti immunogeni. L'esigenza di perseguire nuove e migliori strategie vaccinali costituisce un aspetto con importanti risvolti nella medicina e riguardanti in particolare la profilassi e i possibili trattamenti di immunoterapia. L'analisi proposta è inoltre focalizzata a studi concernenti il virus dell'influenza con possibili ricadute pratiche sulla vaccinazione verso questo patogeno in termini sia di potenziali prodotti favorenti l'immunogenicità dei correnti prodotti vaccinali inattivati, sia in termini di conoscenze specifiche.

Work Package 9: Behavioural and Psycho-Social Aspects of the HIV-1 Infection Related to Vaccine Trials: definition and preparation of information material for seronegative and seropositive individuals to be enrolled in clinical trials

Il Progetto che rappresenta una *Task* all'interno del *Work Package* 9 del progetto ICAV, è finalizzato alla creazione di materiale informativo cartaceo e multimediale, rivolto a volontari sieronegativi/sieropositivi coinvolti nel trial vaccinale.

Nell'ambito della programmazione e della implementazione di uno studio vaccinicò contro l'HIV, la considerazione delle dimensioni psicologiche, sociali e comunicativo-relazionali è fondamentale. In tale ambito soddisfare le esigenze informative dei volontari sieropositivi/sieronegativi rappresenta un elemento centrale di tale processo. L'impatto emotivo della sperimentazione rende pertanto necessaria una "informazione dedicata" per tutti i soggetti coinvolti.

Risultati attesi nel triennio

Progettazione di *vademecum* informativi, cartacei e multimediali, sulle varie fasi della sperimentazione vaccinale rivolti ai volontari sieropositivi/sieronegativi, nonché di un *depliant* esplicativo sul consenso informato e studio di una veste grafica omogenea per tutti i prodotti informativi.

Realizzazione di *vademecum* informativi cartacei sulle varie fasi della sperimentazione vaccinale rivolti ai volontari sieropositivi e ai volontari sieronegativi, nonché di un *depliant* esplicativo sul consenso informato che consenta al volontario una scelta partecipe e consapevole.

Trasferibilità dei risultati

La risposta ai bisogni informativi dei volontari coinvolti nella sperimentazione attraverso un'informazione dedicata può consentire una maggiore adesione al progetto sperimentale e una partecipazione consapevole sia nella fase di reclutamento, che nel corso della sperimentazione. Ciò con l'obiettivo di ridurre il rischio di ritiro dei volontari dal *trial*.

Work Package 9: Behavioural and Psycho-Social Aspects of the HIV-1 Infection Related to Vaccine Trials "Training of psycho-social and clinical investigators to support counselling and communication with seropositive/seronegative volunteers to be enrolled in clinical trial"

Il Progetto è finalizzato alla realizzazione di un percorso formativo rivolto agli operatori psico-socio-sanitari dei siti clinici coinvolti nella sperimentazione del vaccino anti HIV basato sulla proteina TAT. Nell'ambito della realizzazione di un vaccino contro il virus HIV

particolare importanza va attribuita alla dimensione comunicativo-relazionale che caratterizza il rapporto tra volontario sieropositivo/sieronegativo e le figure professionali psico-socio-sanitarie impegnate nei siti clinici coinvolti nella varie fasi della sperimentazione vaccinale con la proteina TAT. I volontari inseriti nel programma potrebbero evidenziare in base ai diversi momenti dell'intervento, problematiche non solo di tipo organico, ma anche di tipo psicologico e sociale. È, quindi, di fondamentale importanza che gli operatori siano in grado di capire le necessità della persona in modo globale, saperle riconoscere e inserirle nel contesto individuale che le ha determinate. Pertanto, la capacità comunicativo-relazionale dell'operatore risulta fondamentale per instaurare una relazione professionale efficace che consenta al volontario di esplicitare eventuali dubbi e difficoltà e di affrontare consapevolmente ogni momento della sperimentazione alla quale ha deciso di sottoporsi. Il presente progetto offre un momento di riflessione sulla peculiarità del processo comunicativo-relazionale tra i vari attori dell'intervento attraverso.

Risultati attesi nel triennio

Analizzare le singole identità professionali degli operatori coinvolti nella sperimentazione vaccinale

Identificare le condizioni e i criteri fondamentali per una reale integrazione fra le diverse professionalità

Identificare i principi fondamentali per una buona comunicazione e le strategie per migliorarla con particolare riferimento alla relazione dell'operatore con se stesso, con la propria *équipe*, con i volontari sieropositivi/sieronegativi e con il loro *entourage*

Identificare i principi e le tecniche per una relazione efficace con il volontario durante tutte le fasi della sperimentazione vaccinale

Identificare le fasi di un intervento di *counselling*

Rendere operative abilità e tecniche dell'intervento di *counselling*.

Trasferibilità dei risultati

Il miglioramento dell'efficacia della comunicazione e della relazione tra operatori e volontari rappresenta un passo indispensabile per attivare il processo di consapevolezza del volontario, ridurre il rischio di "abbandono" del *trial* da parte di quest'ultimo, nonché prevenire il *burn out* dell'operatore. Inoltre, i risultati di tale esperienza potrebbero consentire l'individuazione di buone prassi da applicare in ambito comunicativo-relazionale anche in altre sperimentazioni vaccinali.

**Dipartimento
Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate**

Attività di controllo, valutazione, parere

Attività del *Supranational Reference Laboratory* dell'OMS per la tubercolosi farmacoresistente

Presso il reparto Malattie Batteriche Respiratorie e Sistemiche ha sede il *Supranational Reference Laboratory* (SRL) del WHO per la sorveglianza della tubercolosi (TB) farmacoresistente, che opera in collaborazione con il Laboratorio Nazionale di Villa Marelli di Milano e con una rete di 27 laboratori e 46 centri clinici (progetto SMIRA). Le attività del SRL riguardano il controllo di qualità dell'antibiogramma di *M.tuberculosis* (Mtb) per Italia, Kosovo, Albania, Turchia, Oman, Qatar, Bahrain, Mozambico e studi di prevalenza della TB farmacoresistente in Italia. Presso il reparto vengono anche eseguiti l'isolamento, l'identificazione e l'antibiogramma per 10 farmaci di Mtb da materiali biologici provenienti da pazienti italiani e dell'Abkhazia, una regione dell'ex Unione Sovietica, in collaborazione con Medici Senza Frontiere (MSF). Presso il reparto viene anche eseguita l'identificazione (mediante sequenziamento molecolare e *test* biochimici) e l'antibiogramma di attinomiceti (*Nocardia*, *Rhodococcus* ecc).

Piano triennale

Continuerà l'attività di SRL sia come controllo di qualità dell'antibiogramma per i laboratori nazionali di Italia, Kosovo, Albania, Turchia, Oman, Qatar, Bahrain, Mozambico nonché lo studio della prevalenza di TB farmacoresistente in Italia. Nel 2007 e 2008 verranno eseguiti l'identificazione e l'antibiogramma di ceppi di Mtb di provenienza italiana e dei ceppi inviati per il controllo di qualità del WHO; non verranno più analizzati i ceppi provenienti da MSF se non nei primi mesi del 2005.

Attività di controllo e valutazione su streptococchi, enterococchi e corinebatteri

Il reparto Malattie Batteriche Respiratorie e Sistemiche è dal 1984 sede del WHO *Collaborating Centre for Streptococci and Streptococcal Infections*.

Nell'ambito delle attività del Centro il reparto provvede a fornire su richiesta degli ospedali l'identificazione e la tipizzazione sierologica o molecolare dei ceppi di streptococco beta emolitico. 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'amplificazione di regioni cromosomali specie-specifiche. In particolare, le attività di tipizzazione comprendono per *Streptococcus pyogenes*, la determinazione del tipo di proteina M (*emm typing*), *pattern* T, fattore di opacità, proteasi, geni per le tossine eritrogeniche *speA*, *speB* e *speC*; per *Streptococcus agalactiae* la determinazione del sierotipo e dei geni per le proteine di superficie complesso C/R.

Viene anche determinata la resistenza agli antibiotici con saggi fenotipici e/o genotipici per i geni di resistenza ai macrolidi *erm(B)*, *erm(A)*, *mef(A)*.

Compiti del Centro sono anche la partecipazione a eventuali iniziative WHO, la standardizzazione di metodiche diagnostiche per la diagnosi e profilassi di infezioni streptococciche e delle loro sequele sia suppurative che non suppurative, la distribuzione di ceppi di referenza a Laboratori Nazionali.

Annualmente il Centro è sottoposto a *proficiency test* da parte del WHO *Collaborating Centre* di Colindale che si occupa della distribuzione di campioni per *it typing* molecolare.

Il reparto provvede anche all'identificazione e all'analisi delle resistenze di altri batteri gram positivi come pneumococchi, enterococchi, corinebatteri.

Piano triennale

Le attività sopra descritte continueranno con l'ampliamento delle tecniche di tipizzazione molecolare, quali una analisi molecolare più puntuale dei determinanti molecolari della resistenza alla tetraciclina (geni tetO, tetM) e il miglioramento delle tecniche di tipizzazione di GBS, attualmente effettuato mediante sierotipizzazione, attraverso tecniche combinate di amplificazione molecolare e ibridazione. Si prevede di ampliare le collaborazioni per lo studio dell'epidemiologia delle infezioni da GBS e quella con il Campus Biomedico di Roma per un confronto fra infezioni invasive e non invasive da GAS

Si prevede la continuazione e implementazione delle capacità diagnostiche, di tipizzazione e determinazione della resistenza agli antibiotici di streptococchi, corinebatteri e enterococchi.

Attività di supporto e consulenza ai programmi di Controllo di Qualità della diagnosi *in vitro* delle allergie gestiti dalle Regioni Emilia Romagna e Lombardia

L'attività si esplica attraverso la fornitura di consulenza tecnico-scientifica di supporto ai Programmi di Valutazione Esterna della Qualità (V.E.Q.) del dosaggio di IgE specifiche effettuato per la diagnosi di patologie allergiche. Le Regioni Emilia Romagna e Lombardia si sono rese promotrici dei Programmi di V.E.Q. sui test di dosaggio delle IgE specifiche, e hanno richiesto ufficialmente la consulenza dell'Istituto Superiore di Sanità, che si esplica attraverso la certificazione qualitativa dei sieri che vengono impiegati in tali Programmi. La certificazione viene effettuata su ciascun siero selezionato dagli specialisti allergologi, mediante valutazione della reattività delle IgE umane specifica per i relativi estratti allergenici impiegando sia un saggio immunoenzimatico in condizioni native, sia il *test* dell'immunoblotting in condizioni riducenti.

Piano triennale

Ogni anno vengono valutati sieri per la regione Lombardia e per la Regione Emilia Romagna e si prevede tale attività continuerà per il prossimo 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 ha istituito una rete di sorveglianza delle meningiti batteriche sul territorio nazionale sotto il coordinamento dell'Istituto Superiore di Sanità, in particolare del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica e del Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica. I principali obiettivi della sorveglianza microbiologica sono: Quantificare il contributo relativo dei diversi agenti batterici (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria*, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae*) nell'eziologia delle meningiti batteriche; Raccogliere presso il Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica i ceppi di *Neisseria meningitidis* e di *Haemophilus influenzae* per una tipizzazione fenotipica e genotipica al fine di 1) riconoscere cloni responsabili di focolai epidemici, 2) conoscere il sierogruppo prevalente per una mirata profilassi vaccinale 3) analizzare la sensibilità agli antimicrobici per una corretta terapia e profilassi farmacologica-Monitorare l'uso di una corretta chemioprophilassi nei soggetti che hanno avuto contatti con il caso di meningite e identificare eventuali casi secondari di infezione. Il Responsabile è anche referente per l'Italia nella "rete di sorveglianza europea delle meningiti batteriche" finanziata dal progetto EU-IBIS (*European Invasive Bacterial Infection Surveillance*); Membro dello EMGM (*European Monitoring Group on Meningococci*) dalla sua fondazione nel 1993 ed è stato responsabile scientifico dei seguenti progetti: Progetto Patologia Infettiva ISS 1997-2000 "Le meningiti batteriche" U.O. "Caratterizzazione molecolare dei principali microrganismi responsabili di meningiti batteriche" nel Progetto di Ricerca Corrente

1% 2000-2001 “Nuovi Approcci alla tipizzazione molecolare ai fini della sorveglianza microbiologica e della qualità degli interventi per il controllo delle malattie infettive”

Piano triennale

L'attività di Sorveglianza delle Meningiti Batteriche sopra descritta proseguirà nel triennio con le stesse modalità, ampiamente collaudate negli anni, di collaborazione con le SSN. Saranno comunque messe in atto tutte le possibili attività tendenti a implementare la rete di strutture ospedaliere collaboranti in alcune regioni del Sud Italia ancora poco rappresentate nella Sorveglianza. Inoltre, verrà migliorata la sensibilità della sorveglianza mediante l'uso di metodi molecolari applicati alla diagnosi dei casi identificati clinicamente ma negativi alla coltura. Protocolli per diagnosi molecolare verranno diffusi ai laboratori delle SSN che si renderanno disponibili ad affiancare ai metodi più tradizionali anche quelli che possono riconoscere tracce di DNA nel liquor e nel sangue di pazienti già sottoposti a terapia antibiotica.

In particolare, per quanto concerne *N.meningitidis* verranno individuati nuovi marcatori genici sufficientemente conservati nella popolazione batterica per poter essere utilizzati nell'identificazione, nella tipizzazione e nella rilevazione della resistenza a specifici antibiotici direttamente dai campioni clinici. Questi *target* verranno utilizzati in *real time* PCR, *Multilocus sequence typing* e *PorA VR typing*. Il Centro di Riferimento all'interno della rete europea sarà tenuto a fornire dati relativi all'uso di queste metodiche e ad effettuare controlli di qualità per la standardizzazione dei metodi. Per quanto riguarda *H.influenzae*, la sorveglianza si propone di monitorare i ceppi Hib isolati da malattia invasiva in soggetti vaccinati e non e di individuare i fattori di rischio nei fallimenti vaccinali. In particolare, essendo stata individuata una possibile amplificazione del *locus* cap b, responsabile del numero di copie dei geni per l'espressione del polisaccaride capsulare PRP, verrà analizzato se la pressione vaccinale è in grado di selezionare ceppi con un numero di copie multiple del locus rispetto al numero presente in ceppi isolati da casi avvenuti in epoca pre-vaccinale.

Centro Nazionale per le Leptosirosi umane

Il Centro Nazionale per le Leptosirosi, operante presso il Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità (Reparto Vaccini Batterici), 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, Milano, 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 leptosirosi 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 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.

Piano triennale

Leptospira interrogans sensu lato è un complesso di spirochete responsabili della leptospirosi, una antropozoonosi a diffusione ubiquitaria di grande rilevanza clinica e economica. Contrariamente a quanto comunemente si ritiene, le infezioni da *Leptospira* non sono esclusivamente legate né a particolari categorie professionali né sono localizzate in particolari regioni o zone geografiche e i casi notificati rappresentano solo una parte di esse. *L. interrogans sensu lato* è costituito da un gruppo di leptospire molto eterogeneo sia dal punto di vista immunologico che genetico e comprende oltre 200 serovar (sierovarianti) organizzati in 23 sierogruppi.

Accanto alla classificazione antigenica si è venuto sviluppando nel corso degli ultimi 10 anni, per merito di ricerche di biologia molecolare, un nuovo sistema di classificazione basato sulle omologie DNA/DNA. La sistematica delle leptospire, inizialmente rappresentate da un genere unico *Leptospira*, specie unica *L. interrogans*, ha di conseguenza subito recentemente una importante evoluzione. Sono attualmente proposti come componenti della famiglia *Leptospiraceae* 3 generi e 14 specie. Le implicazioni diagnostiche di questa nuova tassonomia sono evidenti e riguardano principalmente la messa a punto di metodi correnti per la identificazione delle nuove specie. Infatti, solo attraverso la conoscenza dei diversi tipi di *Leptospira* circolanti in Italia è possibile: i) selezionare gli antigeni e le metodiche più idonee da impiegare nell'accertamento diagnostico della leptospirosi; ii) approntare o selezionare i vaccini più adeguati al territorio e alla popolazione da vaccinare; iii) risalire alla probabile fonte di infezione dei diversi casi e mettere in atto le misure preventive più idonee.

Obiettivo primario della ricerca è l'individuazione di divergenze e analogie a livello della struttura molecolare (gnomica e antigenica) dei ceppi rappresentativi delle diverse divisioni tassonomiche di *Leptospiraceae* utili ai fini tassonomici e/o diagnostici. In particolare ci si propone di individuare le metodiche di biologia molecolare più idonee a individuare le divergenze e le analogie nei vari livelli tassonomici di genere, specie e subspecie (sierogruppo e serovar) e, quindi, di discriminare tra leptospire patogene e saprofiti.

Un altro obiettivo è determinare se i tipi *Leptospira* circolanti nel territorio nazionale e causa di infezione nell'uomo sono cambiati rispetto al passato oppure se (a causa delle profonde modifiche climatiche e socioeconomiche e del continuo spostamento di animali verificatesi in questi ultimi anni) c'è stata introduzione di serovar "nuovi" per il territorio nazionale.

Nel Centro Nazionale per le Leptospirosi, Reparto "Vaccini Batterici" del Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, è mantenuta una vasta collezione di leptospire, unica in Italia, che comprende gran parte dei serovar oggi conosciuti, sia patogeni che saprofiti, provenienti dalle diverse parti del mondo. Gli oltre 800 ceppi che costituiscono la collezione rappresentano il materiale di partenza delle ricerche indicate.

Centro OMS di riferimento per gli *arbovirus* e le febbri emorragiche

Il centro di riferimento OMS opera nell'ambito della sorveglianza delle infezioni da *arbovirus* e della febbri emorragiche sia autoctone che di importazione, mediante indagini sul territorio (sui vettori e sugli animali serbatoio), in collaborazione con autorità sanitarie locali, e mediante la diagnosi in casi sospetti, in collaborazione con ospedali e aziende sanitarie locali. Svolge inoltre sorveglianza sul personale a rischio di particolari tipi di infezioni (trasmesse da artropodi o da roditori), in collaborazione con le autorità sanitarie civili e militari.

Piano triennale

Il Centro OMS ha scadenza nel 2008 ed è rinnovabile. Pertanto le attività collegate a tale centro proseguiranno nel triennio 2006-2008.

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 36 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). L'Istituto Superiore di Sanità svolge tale attività su delega del Centro nazionale Trapianti, 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 due anni. Si avvale, anche, della collaborazione con l'Immunoematologia del Policlinico Umberto I, Università "la Sapienza" di Roma, che fornisce le sacche di sangue di donatori, necessarie ai diversi tipi di controlli. 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. In caso i risultati non fossero soddisfacenti per due anni consecutivi, il laboratorio verrà sospeso dall'attività per un minimo di due anni. Il controllo di qualità sulla tipizzazione HLA è strumento essenziale per: definire il livello della qualità della 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

Per il prossimo triennio si prevede di organizzare ed effettuare i controlli di qualità delle tecniche immunogenetiche con protocolli analoghi a quelli usati negli anni precedenti.

Eventuali variazioni degli schemi operativi o del numero dei laboratori partecipanti vengono decise da una speciale commissione del Centro nazionale Trapianti, anche su indicazione dell'EFI, che periodicamente aggiorna le linee-guida dei controlli di qualità europei.

Controllo di Stato (*batch release*) dei vaccini virali per uso umano (DM 07/04/97, DM 11/01/99)

Il reparto si occupa del Controllo di Stato dei vaccini antimorbillo, antiparotite, antirosolia monovalenti e polivalenti, e del vaccino antivaricella. Per i vaccini MMR l'Istituto provvede al Controllo di Stato per il mercato italiano e per l'OMS. Per il vaccino antivaricella l'Italia funge da *Reference Member State* e provvede al *Batch release* per il mercato europeo.

Inoltre il Reparto si occupa della valutazione dei *dossier* tecnici per i seguenti vaccini:

- Vaccini antimorbillo, antiparotite, antirosolia monovalenti e polivalenti
- Vaccino antivaricella
- Vaccino tetravalente antimorbillo, antiparotite, antirosolia, antivaricella (Per questo vaccino l'Italia funge da *Reference Member State*)
- Vaccino antirabbico
- Vaccino contro la Febbre Gialla
- Vaccino contro l'encefalite trasmessa da zecche (TBE)
- Vaccino contro l'Encefalite Giapponese
- Vaccino antivaaioloso

Piano triennale

Proseguiranno le attività di controllo e valutazione dei vaccini virali per uso umano secondo quanto previsto dai decreti legislativi. Tale attività saranno eseguite sotto un sistema di Assicurazione di Qualità che richiederà un continuo aggiornamento. Inoltre proseguirà l'attività di consulenza per conto dell'AIFA sui *dossier* riguardanti questi prodotti.

Controllo di Stato dei vaccini batterici

Nei laboratori del Dipartimento vengono svolte attività di controllo dei vaccini batterici, a singolo o multi-componenti, per uso umano, in particolare dei vaccini difterico-tetaniico, Hib e meningococco, secondo le norme della Farmacopea Ufficiale e con le opportune Procedure Operative *Standard* (POS). Vengono anche svolte attività di farmacovigilanza sugli stessi vaccini. Infine, vengono messi a punto nuovi metodi per la valutazione dell'immunogenicità e la sicurezza dei vaccini batterici. Viene esercitata, infine, un'attività di consulenza e rilascio di pareri sui *dossier* dei vaccini batterici.

Piano triennale

Nel triennio in questione continuerà l'attività di controllo analitico dei vaccini difterico-tetaniico, Hib e meningococco. Si procederà a mettere a punto le POS per passare al controllo di altri tipi di vaccini in modo da ampliare lo spettro di prodotti controllabili durante la *post-marketing surveillance*. Continuerà lo sviluppo di nuovi metodi da utilizzarsi per il controllo dei vaccini glicoconiugati e si parteciperà a studi collaborativi di *proficiency testing* nonché a specifiche attività di formazione..

Controllo di stato delle immunoglobuline normali e specifiche (DM 22 aprile 1996, Legge 4 maggio 1990, n. 107); Controllo di stato del C1q inattivatore (DM 4 agosto 2000, Legge 4 maggio 1990, n. 107)

Per ogni lotto di prodotto sottoposto a controllo di stato il reparto Prodotti Biologici verifica, mediante saggi di Farmacopea Europea, 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). Tale controllo 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 agli OMCLs. Questa attività, a cui fa da supporto una banca-dati, viene svolta in un sistema di assicurazione della qualità che prevede il continuo aggiornamento e la convalida delle metodiche analitiche impiegate.

Piano triennale

Si prevede per il triennio il controllo di oltre 500-600 lotti di immunoglobuline.

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: 1. Controllo dei *Kit* diagnostici, in fase di registrazione e di modifiche di registrazione, ai fini della commercializzazione; 2. 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) 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: a) l'esecuzione di prove di laboratorio come previsto dalla CTS 2002/364/EC del 7 maggio 2002 b) l'esame di documentazione tecnica come previsto dall'Allegato 1 della Direttiva. Tale documentazione deve includere i dati relativi a: - produzione e Controllo di Qualità dei reagenti - saggi di valutazione di efficienza e affidabilità - 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 e 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.

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 e 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.

Una prima fase del programma verrà dedicata alla preparazione della Documentazione Tecnica da inviare al Ministero della Salute come previsto dalla Direttiva. Tale documentazione deve comprendere, 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).

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*.

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*), riveste un ruolo fondamentale in quanto nel suo ambito vengono valutati aspetti generali e particolari afferenti alle problematiche dei farmaci biologici, biotecnologici, immunologici e relativi alle terapie innovative. Una delle principali attività qualificanti di tale gruppo, il cui rappresentante per l'Italia è il titolare della presente linea, 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 *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 recentemente introdotta.

Piano triennale

Per il prossimo triennio è prevista una continuazione e una estensione di tutte le attività illustrate.

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 immunologica e in particolare allergologica sulle autorizzazioni alla sperimentazione animale, inviate al Ministero della Sanità 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

Sarà continuata l'attività con aggiornamento metodologico per la valutazione dei *dossier*.

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 e anti-HCV, 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 e di plasma virus-inattivato viene eseguita anche la determinazione quantitativa del parvovirus B19 DNA.

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 Laboratories* 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.

Per mantenere elevato il livello di tale attività è indispensabile utilizzare metodiche sottoposte a continuo aggiornamento e opportuna convalida e operare in un sistema di assicurazione della qualità, come richiesto dalle linee-guida europee.

Piano triennale

Sulla base dell'esperienza pregressa, si prevede il controllo, per ognuno dei marcatori citati, di circa 900-1200 *pool* di plasma.

Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali (Decreto Legislativo 18 febbraio 1997, n. 44)

L'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), su proposta dell'Istituto Superiore di Sanità, 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 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.

Piano triennale

Tale attività comporterà il controllo di circa 100 lotti e potrebbe essere estesa anche ad altri prodotti immunologici.

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 di una variabilità tra lotti tale da incidere sulle loro caratteristiche di sensibilità e specificità. Il programma prevede la partecipazione gratuita dei laboratori operanti sul territorio nazionale che desiderano aderirvi volontariamente; 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. 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: - l’analisi dei risultati ottenuti dai singoli laboratori rispetto ai risultati ottenuti dal laboratorio di riferimento; - l’analisi dei risultati ottenuti per ciascun campione in tutti i laboratori rispondenti.

Piano triennale

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 entomatiche di alimenti e identificazione di contaminanti in preparati medicinali

Nei Laboratori di Parassitologia vengono eseguite analisi parassitologiche sugli sfarinati e sui funghi secchi secondo le seguenti metodologie :

Filth test sfarinati e loro derivati. Il campione è analizzato secondo il Metodo Ufficiale (G.U. n. 186 del 10/08/1994).

Analisi entomatiche dei funghi secchi. Il metodo per la determinazione delle impurità entomatiche nei funghi secchi fa riferimento ad una procedura operativa *standard* in uso presso l’ISS.

Piano triennale

Le attività saranno continuate nell’arco del prossimo triennio con una frequenza di campioni non preventabili ma stimabili, sulla base dell’esperienza pregressa in circa una sessantina per le analisi dei funghi secchi e una quarantina per gli sfarinati

Sorveglianza della malaria d’importazione

In Italia, la malaria è una malattia a notifica obbligatoria. I laboratori delle Aziende Sanitarie Locali diagnosticano i casi clinici mediante osservazione al microscopio degli strisci ematici. I casi positivi vengono notificati dalle Autorità Sanitarie regionali al Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Sanità. 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. I dati provenienti dai moduli sono inseriti in un archivio e vengono analizzati utilizzando Epi Info v. 5.01.

Piano triennale

Le attività proseguiranno secondo le linee metodologiche sopra descritte. Si stima, anche sulla base della pregressa esperienza, che i preparati ematologici che saranno esaminati nel triennio possano ammontare a circa 3.600.

Sorveglianza e controllo delle infezioni da patogeni enterici

Il Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica svolge da molti anni la funzione di laboratorio di riferimento nazionale per le infezioni da patogeni enterici. L'attività riguarda: 1) compiti di sorveglianza anche in ambito comunitario (progetto ENTERNET) 2) consulenza diagnostica per le strutture del SSN (conferma dei ceppi isolati dai laboratori periferici, controlli di qualità, tipizzazioni fenotipiche e molecolari), 3) intervento in caso di episodi epidemici 4) didattica. In particolare il laboratorio:- conduce indagini diagnostiche su casi sporadici e epidemici di infezione da patogeni enterici quali *Salmonelle*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Shigelle*-tipizza ceppi isolati da casi clinici, alimenti e animali - fornisce stipiti di riferimento a laboratori del SSN- ospita per brevi periodi di addestramento alle tecniche di laboratorio operatori di laboratori del SSN- organizza iniziative didattiche anche in collaborazione con altri Enti o società scientifiche.

Piano triennale

L'attività di controllo e valutazione sopra descritta proseguirà nel triennio 2006-2008 con le stesse modalità. La tipizzazione genotipica mediante elettroforesi in campo pulsato si avvarrà della *cluster analysis* grazie all'acquisizione di un *software* dedicato (*Bionumerics*) e all'addestramento di una unità di personale tecnico. Ciò consentirà di fornire un ulteriore supporto diagnostico alle indagini microbiologiche in corso di focolai epidemici.

Valutazione e controllo disinfettanti e biocidi

Il reparto Malattie Batteriche Respiratorie e Sistemiche valuta, per quanto concerne l'attività battericida, i *dossier* dei prodotti disinfettanti inviati all'ISS dal Ministero della Salute per il parere tecnico per la registrazione come Presidi Medico Chirurgici. Il dipartimento inoltre partecipa attraverso due rappresentanti (con funzioni rispettivamente di presidente e di esperto per l'attività virucida) ai lavori del CEN - *Technical Committee 216/ Disinfectants* che produce le Norme Europee per la regolamentazione della dimostrazione di efficacia di questi prodotti.

Nell'ambito della direttiva europea 98/8/CE del 1998 sui Biocidi per quanto riguarda l'armonizzazione dei saggi di attività dei disinfettanti è stato dato incarico all'OECD di produrre un saggio, sulla base della norma europea per la valutazione dell'attività in superficie. Un esperto del reparto partecipa a quest'attività come rappresentante italiano.

E ancora, sempre nell'ambito della Direttiva europea sui Biocidi che prevede una registrazione centralizzata a livello europeo sia per le sostanze che per i prodotti è stata istituita presso il Ministero della Salute con DM il 29/04/2003 la Commissione Consultiva Biocidi per la valutazione dei *dossier* delle sostanze di competenza italiana. A questa commissione il dipartimento partecipa con suoi rappresentanti per la valutazione dell'efficacia.

Piano triennale

Continuazione dell'attività di valutazione dei *dossier* per la registrazione a seconda delle richieste pervenute al Ministero della Salute.

Prosecuzione del lavoro normativo in ambito CEN/TC216.

Prosecuzione dell'attività in seno alla Commissione Consultiva Biocidi con la valutazione delle sostanze assegnate all'Italia

**Dipartimento
Sanità Alimentare ed Animale**

Attività di ricerca

Aggiornamento e sviluppo di metodi diagnostici e di presidi immunizzanti per le zoonosi batteriche brucellosi e carbonchio ematico, oggetto di profilassi di Stato negli allevamenti degli animali domestici

Le profilassi di Stato delle brucellosi animali e del carbonchio ematico richiedono una continua consulenza da parte dell'ISS volta a risolvere problematiche di interesse diagnostico e di profilassi immunizzante. Tale consulenza è prevista dalle normative comunitarie e nazionali da oltre un ventennio.

L'esercizio di consulenza consiste nella continua ricerca di metodi diagnostici batteriologici, immunologici e biomolecolari sempre più specifici e sensibili che spesso hanno anche il compito di svelare interventi impropri effettuati per eludere la stretta sorveglianza epidemiologica prevista dai piani di eradicazione (brucellosi) o profilassi (carbonchio ematico) dei relativi programmi di Stato per la salvaguardia della salute dell'uomo.

Un particolare interesse riguarda le ricerche su nuovi presidi immunizzanti di recente concezione quale ad esempio il vaccino *B.abortus* RB-51, in fase R, per la brucellosi, o di concezione classica come il vaccino "Sterne" per la profilassi del carbonchio ematico. Di quest'ultimo, solo di recente è stata autorizzata la produzione in Italia per aggiornare a livello europeo la profilassi del carbonchio ematico fino ad oggi effettuata con i vaccini, ormai superati, di tipo "Pasteur".

Il presente progetto riprende linee di ricerca già attive che si prefiggono, in particolare, i seguenti obiettivi:

- messa a punto di tecniche per la tipizzazione molecolare di ceppi di *Brucella spp* e di *Bacillus anthracis* che consentano una più rapida e affidabile diagnosi differenziale nonché un più accurato monitoraggio epidemiologico;

- identificazione di componenti antigeniche in grado di accrescere la sensibilità e specificità dei test sierologici per la sierodiagnosi di brucellosi sostenuta da ceppi di *Brucella spp* sia in fase S che R.

- studio *in vivo* della capacità protettiva di ceppi mutanti rugosi di *B.melitensis* per la messa a punto di presidi immunizzanti innovativi;

- convalida di campo del vaccino RB-51 per la profilassi della brucellosi bufalina;

- studio dei geni di *Brucella* responsabili del fenotipo rugoso e della antibiotico-resistenza, coinvolti nel meccanismo di attenuazione dei ceppi patogeni;

- valutazione della diffusione ambientale di *Bacillus anthracis* in alcune aree italiane attraverso l'analisi della presenza di anticorpi anti-fattori tossici in animali da pascolo, mediante tecniche immuno-enzimatiche;

- studio delle aspecificità delle sierodiagnosi brucellari riscontrabili nei ruminanti in regioni ufficialmente indenni da brucellosi, attraverso la ricerca diretta di differenti determinanti antigenici mediante metodiche biotecnologiche.

Risultati attesi nel triennio

- Definizione delle cause della comparsa delle aspecificità nell'ambito delle reazioni sierodiagnostiche per le brucellosi animali e proposte di adozione di nuove strategie diagnostiche biotecnologiche;

- messa a punto di un nuovo *kit* rapido a lunga conservazione per il rilievo degli anticorpi verso ceppi brucellari in fase R come *B.abortus* RB51 e *B.ovis*.

- identificazione di ceppi di *B.melitensis* in fase R con caratteristiche fenotipiche e genotipiche particolarmente favorevoli a un loro utilizzo a scopo vaccinale nella profilassi ovi-caprina;

- identificazione dei geni responsabili del fenotipo rugoso e della antibiotico-resistenza di ceppi brucellari in fase rugosa.

mappatura degli ambienti contaminati da *B.anthraxis* attraverso un *test* immunoenzimatico sugli animali provenienti dalle zone a rischio.

Trasferibilità dei risultati

Rafforzamento e miglioramento delle misure di sorveglianza sier-epidemiologica nell'ambito dei piani di eradicazione delle brucellosi animali;

programmazione degli interventi vaccinali contro il carbonchio ematico sulla base della mappatura dei territori contaminati con *B.anthraxis*;

aggiornamento di acquisizioni specifiche nell'ambito del carbonchio ematico e delle brucellosi animali di cui l'ISS è consulente scientifico del Ministero della Salute;

approfondimento di collaborazioni scientifiche con gli Istituti Zooprofilattici sugli argomenti in questione, oggetto di sorveglianza da parte dell'ISS, come previsto in termini di legge

Analisi del rischio correlato alla presenza di residui negli alimenti di origine animale (SARA)

Valutazione dell'esposizione ad anabolizzanti e contaminanti attraverso la dieta per fasce di popolazione vulnerabili (bambini).

Sviluppo di metodi analitici di *screening* (biosensori) e di conferma (spettrometria *tandem*) per l'identificazione di metaboliti in seguito a trattamenti con anabolizzanti nelle produzioni zootecniche.

Identificazione di biomarcatori nell'uomo e nell'animale in seguito a trattamenti con promotori di crescita.

Valutazione della correlazione tra dieta alimentare ricca di fitosteroli e formazione di anabolizzanti nelle produzioni zootecniche.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione dell'esposizione ad anabolizzanti e contaminanti attraverso la dieta per fasce di popolazione vulnerabili (bambini).

Caratterizzazione e validazione metodi di analitici di *screening* (biosensori) e di conferma (spettrometria *tandem*) per l'identificazione di metaboliti in seguito a trattamenti con anabolizzanti nelle produzioni zootecniche.

Caratterizzazione e validazione di biomarcatori nell'uomo e nell'animale in seguito a trattamenti con promotori di crescita.

Identificazione di metaboliti specifici per anabolizzanti correlati a una dieta alimentare ricca di fitosteroli nelle produzioni zootecniche.

Trasferibilità dei risultati

I metodi di prova caratterizzati e validati potranno essere trasferiti ai laboratori di controllo (IIZZSS) sul territorio nazionale.

Analisi del rischio correlato alla presenza di residui negli alimenti di origine animale (SARA) - UO2: Validazione di indicatori: sviluppo di modelli sperimentali *in vitro* e garanzia della qualità

L'identificazione di indicatori per la caratterizzazione del rischio da xenobiotici richiede il loro sviluppo in studi sperimentali *in vivo* e *in vitro*, la loro validazione analitica e epidemiologica e la loro applicazione sul campo. In questo ambito l'obiettivo 1 è lo sviluppo e la caratterizzazione di modelli sperimentali *in vitro* per l'analisi comparativa dell'espressione genica di sistemi cellulari di controllo e sistemi cellulari esposti a xenobiotici. Lo studio della modulazione dell'espressione genica e individuazione di eventuali indicatori indiretti di esposizione in modelli sperimentali scelti verrà eseguita mediante la tecnologia di PCR *Real*

Time. La validità degli indicatori si basa in gran parte sull'affidabilità dei risultati analitici, ma, a fronte dell'ampiezza, complessità e novità del repertorio analitico, questo settore si osserva una carenza dei principali strumenti per la realizzazione di questo obiettivo (materiali di riferimento e programmi di valutazione esterna di qualità). L'obiettivo 2 è lo sviluppo di un modello operativo per la realizzazione di programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ) nel settore della sicurezza alimentare, in accordo alle linee guida internazionali, potenziando e sostenendo esperienze già presenti.

Risultati attesi nel triennio

1.1 Messa a punto di modelli sperimentali *in vitro* per l'analisi comparativa dell'espressione genica di sistemi cellulari di controllo e sistemi cellulari esposti a xenobiotici.

2.1 Elenco degli analiti di interesse prioritario per lo sviluppo di programmi di VEQ;

2.2 Criteri per la preparazione e valutazione di materiali di controllo e stesura delle relative procedure operative;

2.3 Definizione delle strategie di distribuzione, delle modalità di elaborazione e di valutazione dei risultati e stesura delle relative procedure operative.

2.4 Stesura di tutta la documentazione necessaria per la gestione di tale attività in conformità alle norme internazionali per i sistemi di gestione della qualità

Trasferibilità dei risultati

1. Verrà valutata la trasferibilità degli indicatori indiretti di esposizione a xenobiotici su modelli sperimentali *in vivo*, al fine di fornire uno strumento analitico da utilizzare nell'analisi del rischio in alimenti di origine animale.

2. L'implementazione dei programmi di VEQ ha lo scopo di fornire uno strumento per la valutazione delle prestazioni dei laboratori deputati al controllo ufficiale degli alimenti, come richiesto dalle norme internazionali (UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

Le metodologie e il sistema di gestione di tale attività potrà essere trasferito ad altri programmi di VEQ nel settore della sicurezza alimentare.

Analisi del rischio correlato alla presenza di residui negli alimenti di origine animale (SARA) - UO5: Sviluppo di metodi innovativi di conferma per lo studio dei residui di promotori di crescita nelle produzioni alimentari

L'obiettivo del progetto prevede lo sviluppo di metodi innovativi di conferma per lo studio di residui di sostanze ad effetto anabolizzante e di altre sostanze farmacologicamente attive negli animali da reddito. In particolare, l'applicazione dei metodi di conferma, basati sulle tecniche di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) e massa tandem (LC-MS-MS), è indirizzata sia alla validazione dei metodi di *screening* basati su biosensori e immunosensori, sia alla caratterizzazione dei profili ormonali in animali da reddito e discriminazione fra steroidi endogeni e da trattamenti illeciti e dei fenomeni di bioconversione microbica di precursori di origine vegetale di steroidi presenti negli alimenti per animali.

Lo sviluppo delle tecniche LC-MS e LC-MS-MS è mirato inoltre all'individuazione di *marker* per la valutazione del rischio per fasce di popolazione vulnerabili.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione e validazione di metodi di conferma LC-MS e LC-MS-MS per l'identificazione di metaboliti specifici in seguito a trattamento con anabolizzanti, endogeni, di origine vegetale (fitosteroli) e di sintesi, in animali da reddito.

Caratterizzazione dell'esposizione a sostanze ad effetto anabolizzante attraverso la dieta per fasce di consumatori vulnerabili.

Trasferibilità dei risultati

I metodi analitici di conferma sviluppati potranno essere trasferiti ai laboratori (II.ZZ.SS) che, sul territorio nazionale, operano nell'ambito del controllo ufficiale dei prodotti alimentari di origine animale.

AQUAMAX

Il Progetto Integrato AQUAMAX (finanziato nell'ambito del 6° Programma Quadro, Priorità 5 "Qualità e Sicurezza Alimentare") si prefigge di valutare l'applicabilità in termini zootecnici e l'impatto sulla qualità e sicurezza di prodotti ittici di mangimi innovativi per acquicoltura, prodotti con proteine vegetali in modo da minimizzare il rischio di esposizione a contaminanti persistenti, in primo luogo interferenti endocrini.

Le attività dell'ISS nell'ambito del *Workpackage* 3 ("Studi tossicologici") riguardano la messa a punto di modelli sperimentali su roditori in fasi biologiche suscettibili (gravidanza, sviluppo postatale sino alla maturità sessuale) per la valutazione comparativa dell'alimentazione con pesci trattati con mangimi tradizionali e innovativi, anche mediante l'uso di approcci tossicogenomici.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di modelli sperimentali integrati per la valutazione della sicurezza di prodotti ittici

Valutazione comparativa della sicurezza per i consumatori dell'uso di mangimi tradizionali e innovativi in acquicoltura

Trasferibilità dei risultati

Trasferibilità dei risultati prodotti:

Nuovi modelli per la valutazione della sicurezza dei mangimi

contributo allo sviluppo di tecnologie produttive in acquicoltura più sicure per i consumatori

Attività di controllo per i prodotti diagnostici e vaccini utilizzati nelle profilassi di Stato per il controllo delle zoonosi batteriche (Brucellosi, Carbonchio ematico e Tuberculosis bovina)

Il progetto si inserisce in un piano di attività per l'implementazione delle profilassi delle zoonosi batteriche (brucellosi, carbonchio, tubercolosi) che coinvolge il Ministero della Salute, gli Istituti Zooprofilattici e il Reparto Profilassi e controllo zoonosi batteriche del Dip. SAAN dell'ISS.

L'attività si basa su norme comunitarie e nazionali che indicano l'ISS come ente di riferimento per la standardizzazione e il collaudo delle tecniche diagnostiche *in vivo* e *in vitro*, dei prodotti diagnostici unici nazionali e dei vaccini, per l'attuazione delle profilassi di Stato.

Le attività per il 2006-8 sono supportate e integrate da sperimentazioni complementari, articolate come segue:

Brucella.

Stesura e convalida, secondo sistemi di qualità, dei protocolli di standardizzazione degli antigeni nazionali e del siero nazionale standard per la sierodiagnosi brucellare.

Stesura e convalida dei protocolli per la standardizzazione e il controllo di qualità dell'antigene utilizzato in fissazione del complemento per il rilievo di anticorpi anti-RB51: Tali protocolli verranno proposti all'OIE come innovativi.

Stesura e convalida dei protocolli per il controllo di innocuità e efficacia del vaccino RB51.

Carbonchio.

Messa a punto del controllo di qualità del vaccino Sterne di recente autorizzato dal Ministero per la profilassi del carbonchio negli animali..

Sperimentazione per l'utilizzo del vaccino Sterne negli animali selvatici.

Valutazione della diffusione ambientale di *Bacillus anthracis* in alcune aree italiane attraverso il rilievo di anticorpi anti-fattori tossici in animali da pascolo, mediante tecniche immunoenzimatiche.

Tubercolosi

Sviluppo di un *test in vitro* alternativo (gamma-interferon *test*) a quanto stabilito dalla Farmacopea che prevede l'uso di cavie per la valutazione degli allergeni (PPD).

Risultati attesi nel triennio

Messa in qualità di tutte le attività di controllo, espletate dal Reparto Profilassi e Controllo delle zoonosi batteriche in base a normative comunitarie o nazionali, su prodotti diagnostici e presidi immunizzanti utilizzati nei piani di eradicazione delle brucellosi animali, della tubercolosi bovina e nei piani di profilassi contro il carbonchio ematico.

Risoluzione dei problemi legati alla certificazione di qualità dei prodotti diagnostici e vaccini per i piani di eradicazione sotto l'egida dell'ISS.

Metodi innovativi per la standardizzazione e il controllo del vaccino RB51, da proporre all'OIE per l'inserimento nei relativi manuali diagnostici.

Test in vitro per la standardizzazione delle tubercoline PPD alternativi ai *test* ufficiali della farmacopea che prevedono l'uso di animali da laboratorio

Utilizzazione del vaccino Sterne contro il carbonchio ematico negli animali selvatici come per esempio cervi dei parchi italiani dove in passato si sono verificati focolai carbonchiosi.

Mappatura di alcune terreni da pascolo contaminati da *Bacillus anthracis*.

Trasferibilità dei risultati

Miglioramento delle misure di sorveglianza sierologico-epidemiologica nell'ambito dei piani di eradicazione delle brucellosi animali e della tubercolosi bovina

Programmazione degli interventi vaccinali contro il carbonchio ematico sulla base della mappatura dei territori contaminati con *B.anthraxis*.

Acquisizioni specifiche nell'ambito del carbonchio ematico, delle brucellosi animali e della tubercolosi bovina di cui l'ISS è consulente scientifico del Ministero della Salute.

Approfondimento di collaborazioni scientifiche con gli Istituti Zooprofilattici sugli argomenti in questione, oggetto di sorveglianza da parte dell'ISS, come previsto in termini di legge.

CASCADE

Il *Network* di Eccellenza CASCADE (finanziato nell'ambito del 6° Programma Quadro, Priorità 5 "Qualità e Sicurezza Alimentare") si prefigge di creare una rete di competenze europea per la valutazione del rischio di interferenti endocrini e altri contaminanti potenzialmente presenti nelle catene alimentari, con particolare attenzione alle sostanze che, interagendo con recettori nucleari, possono agire a dosi molto basse o in sinergia (es., diossine, bisfenolo, fitoestrogeni, pesticidi dicarbosimidi). Il *Network* riunisce 25 Partners di 15 Paesi con competenze afferenti alla biologia molecolare, chimica analitica, epidemiologia e tossicologia. L'ISS partecipa alle attività di CASCADE sia per la messa a punto di modelli per la valutazione del rischio di pesticidi dicarbosimidi, sia per la creazione di una rete per la formazione di giovani ricercatori nel campo del rischio chimico.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di modelli per la valutazione del rischio di pesticidi dicarbosimidi
organizzazione di corsi internazionali di formazione

Trasferibilità dei risultati

Modelli per la raccolta e valutazione delle informazioni su esposizioni a sostanze chimiche applicabili a livello territoriale

modelli per la formazione interattiva nel campo del rischio chimico

Clonaggio molecolare e caratterizzazione antigenica di virus enterici ed epatitici a trasmissione zoonotica

Verranno effettuati il clonaggio e l'espressione delle proteine capsidiche di *rotavirus*, VP8 e VP4, sia di origine umana che animale, per saggiarne il possibile impiego quali vaccini a subunità. La conservazione delle proprietà antigeniche dei peptidi sarà saggiata con anticorpi monoclonali; l'immunogenicità dei siti di protezione verrà valutata tramite produzione di anticorpi specifici in topo. Gli anticorpi monoclonali ottenuti saranno anche studiati per studiare i meccanismi di neutralizzazione. Sarà espressa la proteina non strutturale NSP4 di ceppi umani e animali, per verificarne l'attività enterotossica *in vivo* e *in vitro*. Sarà completato il clonaggio molecolare e l'espressione di ceppi epidemici di *norovirus* in sistemi eucariotici. Le "virus-like particles" (VLP) prodotte saranno impiegate per generare pannelli di anticorpi monoclonali diagnostica e caratterizzazione dei virus stessi. Sarà effettuato il clonaggio di ceppi di virus dell'epatite E (HEV) di origine suina, che verranno identificati attraverso analisi molecolari condotte in allevamenti del centro-nord Italia. I cloni ottenuti saranno espressi in baculovirus ricombinante per ottenere VLP impiegabili come antigene, per generare sieri policlonali e anticorpi monoclonali. Il sequenziamento della regione dell'ORF2 di HEV consentirà di stabilire le relazioni tra ceppi animali e isolati da uomo, per identificare l'effettivo potenziale zoonotico di questi patogeni emergenti.

Risultati attesi nel triennio

Per i diversi virus studiati, verranno messi a punto sistemi d'espressione idonei a produrre peptidi virali o VLP con caratteristiche antigeniche e immunogeniche conservate. In particolare per *rotavirus*, verranno ottimizzati i protocolli per la somministrazione mucosale degli antigeni, al fine di indirizzare la risposta immunitaria alle regioni di maggiore interesse per la protezione. Verranno generati anticorpi monoclonali verso le regioni critiche per la protezione sul capsido di *rotavirus*, e saranno prodotti e studiati anticorpi monoclonali verso la proteina "enterotossica" NSP4, per studiarne il meccanismo patogenetico. Saranno studiati gli epitopi sulla proteina capsidica di calicivirus importanti per la diagnostica e la caratterizzazione virale, e verranno comparate le variazioni genetiche e aminoacidiche di ceppi di norovirus lungo linee evolutive, al fine di identificare possibili regioni implicate nella protezione dall'infezione. Verranno prodotte proteine ricombinanti e VLP di ceppi autoctoni di virus epatitico suino SHEV, e saranno prodotti reagenti immunologici monoclonali e policlonali atti a studiare la diffusione zoonotica del virus. Verranno generate sequenze nucleotidiche per i tre virus indicati, che saranno condivise in ambito di *network* europei. Sono previste pubblicazioni scientifiche di livello e possibili brevetti su anticorpi monoclonali, che potranno trovare impiego in campo sanitario sia per la diagnosi di malattia che per la profilassi vaccinale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno condivisi con la comunità scientifica attraverso pubblicazioni, convegni e seminari. La produzione di conoscenza sarà utile per la messa a punto di vaccini per *rotavirus* e diagnostici per *calicivirus* e virus dell'epatite E. I dati sulla diffusione di ceppi zoonotici di rotavirus saranno utili in vista dell'introduzione di vaccini vivi attenuati. La messa a punto di sistemi diagnostici e la creazione di database di epidemie e sequenze nucleotidiche per *norovirus* e HEV favorirà lo studio epidemiologico delle forme di gastroenterite epidemica e di epatite trasmessa da alimenti o per via zoonotica, attraverso collaborazioni tra ISS e altre

strutture del SSN. Questa ricerca è propedeutica alla messa in opera di attività diagnostiche in Italia, ai fini di una futura rete di sorveglianza delle tossinfezioni alimentari da *Norovirus*, con l'ISS quale laboratorio di riferimento nazionale, in collegamento con gli attuali *partner* europei collaboranti a progetti EC.

Contaminazione chimica in Antartide da elementi potenzialmente tossici: indicatori ambientali, Banca Campioni Ambientali Antartici e materiali di riferimento certificati

Il trasferimento di sostanze chimiche di origine antropica dall'emisfero nord a quello sud costituisce motivo di preoccupazione crescente, in particolare per il mantenimento delle condizioni ambientali originali del continente antartico. Il patrimonio di informazioni acquisite fino ad oggi circa i processi di contaminazione ambientale in Antartide costituisce una prova evidente del fatto che tali fenomeni non possono più essere considerati irrilevanti, ma anzi richiedono un'azione coordinata e sistematica di valutazione, in prima battuta, della loro entità, informazione indispensabile per poi procedere alla elaborazione di opportune strategie di contenimento e, possibilmente, di riduzione dei processi stessi e dei loro effetti negativi. Le conoscenze attuali sulla distribuzione degli inquinanti di maggiore rilevanza per il continente antartico nelle varie matrici ambientali e biologiche hanno certamente contribuito a delineare un quadro di massima dell'andamento della contaminazione in queste regioni. Rimane tuttavia aperta la necessità di una azione più sistematica di valutazione dello stato di inquinamento in Antartide e dell'individuazione di opportuni indicatori per i diversi gruppi di sostanze di interesse.

La diffusione nell'emisfero australe di elementi chimici inquinanti e il loro accumulo nei diversi comparti ambientali va infatti considerato in maniera integrata sia come matrice preferenziale di destino finale delle sostanze che in relazione ai processi di bioaccumulo negli organismi. Infatti, anche se le catene trofiche in Antartide sono relativamente più semplici di quelle riscontrabili in zone meno estreme del pianeta, la loro rilevanza è comunque notevole. La progressiva concentrazione di elementi potenzialmente tossici negli organismi più complessi fornisce pertanto una indicazione assai utile ai fini della valutazione dell'andamento temporale dei fenomeni di inquinamento. La ricerca prende in esame, da questo punto di vista, l'ambiente marino antartico data la ricchezza di specie animali che lo contraddistinguono rispetto agli altri comparti ambientali. La capacità degli organismi marini di fungere da indicatori dei livelli di contaminazione ambientale sarà valutata in relazione alla natura dell'elemento inquinante e ai livelli riscontrati nelle matrici ambientali circostanti. Pertanto, si prenderanno in esame acqua, ghiaccio e sedimenti marini. Tra gli organismi marini che meglio possono prestarsi all'impiego come indicatori ambientali verranno presi in considerazione l'*Euphausia superba* (specie predominante delle 85 specie di *krill* note e che costituiscono l'alimento principale per molte altre specie animali), l'*Adamussium colbecki* e la *Laternula elliptica* (entrambi molluschi bivalvi largamente predati da altri organismi marini), il *Trematomus bernacchii* (pesce sempre più usato per l'alimentazione umana), nonché la *Iridea cordata* (una macroalga diffusa nell'Oceano Meridionale). Tanto le matrici inorganiche che quelle biologiche verranno saggiate per il loro contenuto di elementi chimici potenzialmente tossici (ad esempio, i ben noti metalli pesanti, l'arsenico e gli elementi del gruppo del platino derivanti dall'impiego delle marmitte catalitiche per autotrazione). Per gli organismi marini, inoltre, verranno condotte indagini in merito alla induzione di metallotionine e di altre proteine indicatrici come risposta allo *stress* conseguente all'accumulo di elementi quali cadmio, rame, piombo e zinco.

A tal fine la ricerca intende avvalersi nella massima misura possibile della Banca Campioni Ambientali Antartici (BCAA), istituita già da alcuni anni a cura del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA), per accertare gli andamenti temporali pregressi per ogni coppia

matrice-inquinante, nonchè favorire l'ulteriore sviluppo della BCAA con altri campioni di matrici ambientali e biologiche che si rendano disponibili. La ricerca mira inoltre a valutare la fattibilità della certificazione e della produzione di nuovi materiali di riferimento in matrici antartiche per il controllo di qualità delle misure sperimentali.

Il progetto proposto si collega in modo funzionale ad attività e prodotti già oggetto di precedenti progetti del PNRA, in particolare per quanto riguarda le serie storiche di dati chimici su campioni ambientali e le procedure messe a punto per la preparazione e certificazione di materiali di riferimento.

Il progetto si svolgerà in collaborazione con:

1. Università di Genova, sede della BCAA;
2. Istituto Centrale per la Ricerca Applicata al Mare (sedi di Roma e Venezia);
3. Università Ca' Foscari di Venezia;
4. Politecnico delle Marche (sede di Ancona).

Risultati attesi nel triennio

L'identificazione dei più idonei indicatori di contaminazione ambientale per i diversi elementi chimici potenzialmente tossici consentirà di monitorare con maggiore efficacia l'andamento dei processi globali di trasporto di tali inquinanti nell'emisfero sud e di comprenderne meglio i meccanismi.

L'approntamento di materiali di riferimento certificati per i contaminanti considerati permetterà di verificare l'attendibilità delle misure sperimentali eseguite e di mantenere l'affidabilità delle procedure analitiche impiegate.

La BCAA potrà, a sua volta, avvalersi dei dati ottenuti e dei materiali prodotti per incrementare quanto già posseduto e per renderlo disponibile, su richiesta, ad utenze qualificate.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni conseguite nell'ambito di questo progetto possono essere utilizzate nel quadro di una articolata valutazione delle possibili relazioni tra fenomeni di inquinamento nel continente antartico e variazioni climatiche globali, di rilevanza, pertanto, anche per l'emisfero nord.

Potranno inoltre essere messi a punto programmi di monitoraggio per elementi chimici potenzialmente tossici mirati alla matrici più significative sotto questo profilo.

Infine, i nuovi materiali di riferimento in matrice antartica di cui si prevede la certificazione potranno essere resi disponibili, dietro pagamento, ai laboratori dei paesi attivi nella ricerca in Antartide che intendessero avvalersene.

Diagnosi e caratterizzazione molecolare dei virus influenzali aviari

Dal 1997, vengono segnalati in diversi Paesi un aumento significativo delle infezioni umane causate da stipiti influenzali di origine aviaria (H7N7, H5N1, H9N2, H7N3). La maggior parte dei casi è stata correlata al contatto diretto con pollame infetto, mentre limitati sono stati i casi di trasmissione interumana. La possibilità che virus aviari acquisiscano la capacità di trasmettersi in modo efficiente da uomo a uomo, costituisce la base per l'emergenza di un nuovo virus pandemico.

Negli ultimi anni anche in Italia si sono registrate epidemie di influenza aviaria in aree a elevata densità avicola. In particolare i virus influenzali H5 e H7, introdotti a seguito di contatto tra selvatico e volatili domestici, hanno determinato l'insorgenza di cinque epidemie da virus a bassa e ad alta patogenicità, che hanno causato elevati danni economici all'intero settore avicolo nazionale, con potenziale rischio di infezione per l'uomo. Risulta quindi indispensabile predisporre sistemi di controllo in grado di identificare precocemente la circolazione di virus influenzali tipo A, sottotipi H5 e H7 a bassa patogenicità (LPAI), nelle popolazioni di volatili

domestici e selvatici. La continua circolazione di ceppi LPAI dei sottotipi H5 e H7 rappresenta un rischio evidente di comparsa di nuovi virus ad alta patogenicità (HPAI).

La diagnosi di influenza aviaria in caso di sospetto di infezione in allevamenti avicoli è un passo cruciale per attivare tempestivamente le misure di controllo. Contemporaneamente alla diagnosi è determinante la tipizzazione rapida dei virus identificati, considerata l'esistenza di differenti livelli di rischio sanitario associati alla circolazione di sottotipi virali a diversa patogenicità.

Le caratteristiche strutturali dei virus influenzali consentono loro di modificarsi nel tempo; inoltre alcune popolazioni di uccelli selvatici, serbatoio dei virus influenzali in natura, possono facilitare tali modifiche favorendo fenomeni di riassortimento genico.

La identificazione rapida degli isolati virali permetterà la successiva caratterizzazione genica e antigenica, attraverso le quali sarà possibile valutare il fenomeno di riassortimento genico e del *drift* antigenico.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo e standardizzazione di RRT-PCR quantitativa (qRRT-PCR) ad elevata sensibilità e specificità, che consenta 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 influenzali aviari di tipo A comprendenti sottotipi diversi di emoagglutinine, oltre a virus influenzali umani, suini ed equini e su campioni di campo prelevati da specie aviarie domestiche e selvatiche.

Il *test* di qRRT-PCR in grado di identificare virus influenzali di tipo A, verrà successivamente migliorato disegnando e valutando la sensibilità di sonde specifiche per i sottotipi di influenza aviare H5 e H7 e di sonde specifiche per emoagglutinine di virus influenzali umani attualmente circolanti.

Sequenziamento di geni dei virus influenzali isolati in Italia dalle specie aviarie, al fine di identificare mutazioni costanti nelle sequenze aminoacidiche di geni codificanti per le proteine superficiali e interne dei virus a bassa e alta patogenicità.

Analisi molecolare di virus influenzali isolati nelle popolazioni equine e suine.

Trasferibilità dei risultati

Definizione di un protocollo unico di diagnostica per virus influenzali da applicare su campioni biologici umani e animali; prove di validazione della metodica in *ring-test* con laboratori nazionali di virologia.

Sorveglianza virologica sulla circolazione dei virus influenzali nelle popolazioni animali.

Collaborazioni scientifiche con gli Istituti Zooprofilattici sulle tematiche in questione.

Effetti cronici delle diete ipocaloriche, ipoproteiche e dell'esercizio fisico sulla prevenzione dell'obesità e delle patologie cronico degenerative associate all'invecchiamento (malattie cardiovascolari e cancro)

In Italia circa il 40% delle morti sono causate da patologie cardio- e cerebro-vascolari, e un altro 30% è dovuto al cancro. Purtroppo questi numeri sono destinati ad aumentare, poiché è attualmente in corso un grave epidemia di obesità addominale. Secondo le ultimissime stime in Italia circa il 50% degli uomini e il 34% delle donne tra i 35 e i 74 anni sono in sovrappeso, mentre il 18% degli uomini e il 22% delle donne sono obesi. Negli ultimi anni è stata chiaramente dimostrata l'esistenza nell'uomo di una stretta correlazione tra l'accumulo di grasso a livello addominale e la patogenesi della sindrome plurimetabolica, caratterizzata da insulino-resistenza, diabete mellito tipo 2, dislipidemia e ipertensione arteriosa. Tutti questi sono potenti fattori di rischio per l'infarto cardiaco, l'ictus cerebrale e lo scompenso cardiaco. Vi sono inoltre crescenti evidenze scientifiche che supportano una stretta associazione tra

introito calorico, accumulo di grasso addominale, e rischio di sviluppare cancro al colon, mammella, rene, ed endometrio. Recentemente abbiamo dimostrato che le diete ipocaloriche ben bilanciate prevengono l'obesità e il diabete mellito di tipo 2, riducono potentemente i fattori di rischio cardiovascolare e l'infiammazione (Fontana L et al., PNAS 2004), e rallentano l'invecchiamento del sistema cardiovascolare (Meyer T et al., JACC 2006) nell'uomo. Abbiamo anche dimostrato che l'asportazione chirurgica di grasso addominale sottocutaneo in assenza di modificazioni del bilancio energetico non induce un miglioramento dell'insulina resistenza, e non riduce le adipochine infiammatorie e i fattori di rischio cardiovascolari (Klein S et al., NEJM 2004). Abbiamo infine dimostrato che le diete ipoproteiche e ipocaloriche, e l'esercizio fisico di tipo aerobico, agendo con meccanismi diversi, sono in grado di ridurre alcuni fattori di rischio per il cancro.

Risultati attesi nel triennio

Il nostro obiettivo primario per il triennio 2006-2008 è quello di approfondire le conoscenze sull'effetto delle diete ipocaloriche e dell'esercizio fisico nella prevenzione delle alterazioni metaboliche e ormonali associate all'obesità addominale. In particolare ci prefiggiamo di capire i meccanismi attraverso cui la riduzione della massa grassa, ottenuta mediante restrizione calorica o esercizio fisico di tipo aerobico, possa influenzare il metabolismo gluco-lipidico, l'assetto ormonale e infiammatorio. Un altro obiettivo è quello di studiare in dettaglio la relazione tra introito calorico, bilancio energetico, apporto proteico e i fattori di crescita/ormoni che infleunzano la patogenesi delle più frequenti forme di cancro. Inoltre ci proponiamo di studiare usando modelli cellulari l'effetto di diverse concentrazioni di macronutrienti e di fattori di crescita sulla modulazione genica e *post*-genica di molecole chiave nella patogenesi del cancro e dell'invecchiamento cellulare.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questa ricerca forniranno nuovi dati sull'effetto di diete moderatamente ipocaloriche, nutrizionalmente ben equilibrate, e dell'esercizio fisico nella prevenzione dell'obesità addominale, delle patologie cardiovascolari e delle più comune forme di cancro. I risultati di queste ricerche forniranno inoltre una migliore comprensione dei meccanismi biologici e molecolari che collegano l'assunzione calorica, la composizione corporea, il metabolismo e l'assetto ormonale con il diabete, il cancro e l'invecchiamento cardiovascolare. Aiuteranno inoltre a identificare nuovi *marker* fisiologici e biochimici utili per l'identificazione precoce di individui a maggior rischio per malattie cardiovascolari e cancro.

Effetti degli acidi grassi poliinsaturi della dieta sulla modulazione dello stress ossidativo nel cervello di ratto e loro implicazione in patologie neurodegenerative

Approfondire gli studi sull'effetto degli acidi grassi poliinsaturi della serie n-3 (PUFAs), in particolare dell'acido eicosapentaenoico (EPA) e docosaesaenoico (DHA), sullo stato *redox* del cervello. L'interesse è rivolto allo stress ossidativo in quanto sembra giocare un ruolo chiave nell'insorgenza di alcune malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson e la sclerosi multipla.

La prima fase della ricerca verrà effettuata *in vitro* utilizzando linee cellulari di glioblastoma di ratto, cellule nervose caratterizzate da un basso contenuto in acidi grassi poliinsaturi. Tale deficienza ci permetterà di manipolare il loro contenuto in n-3PUFA mediante una supplementazione esogena di acidi grassi. In particolare si studierà l'effetto dose dei differenti n-3PUFAs sullo stato ossidativo delle cellule nervose.

Successivamente in studi *in vivo* si valuterà lo stato *redox* del cervello e alcuni *marker* associati a patologie neurodegenerative in ratti, trattati con differenti acidi grassi della serie n-3 nelle prime fasi della vita postatale e sottoposti a *stress* ossidativo in età adulta.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione degli acidi grassi della serie n-3 maggiormente coinvolti nell'induzione dello *stress* ossidativo.

Determinazione della concentrazione del DHA e dell'EPA che non altera l'equilibrio *redox* della cellula.

Identificazione di fattori di rischio nutrizionale, che possono essere correlati all'evoluzione delle abitudini alimentari, allo scopo di sviluppare strategie svolte a contrastare o prevenire lo sviluppo di patologie neurodegenerative

Chiarire il ruolo dell'alimentazione neonatale nell'insorgenza di patologie legate all'invecchiamento.

Trasferibilità dei risultati

I risultati finali saranno compendati in pubblicazioni e saranno oggetti di un convegno sui rischi e vantaggi nell'introduzione di acidi grassi nell'alimentazione umana. I risultati saranno trasferiti al SSN.

Effetti endocrini di contaminanti alimentari

Lo studio si svolge in collaborazione con l'Università di Roma "La Sapienza", l'Istituto di Ricerca sugli Alimenti e la Nutrizione e l'ENEA Casaccia. Sulla base delle indicazioni dell'*European Food Safety Authority* e di altre agenzie internazionali sono stati identificati alcuni contaminanti prioritari: composti persistenti (HCH), potenziali interferenti endocrini che possono specificamente contaminare, anche per passaggio da contenitori, gli alimenti per l'infanzia (bisfenolo, semicarbazide).

La ricerca ha l'obiettivo di mettere a punto modelli per la valutazione integrata degli effetti a breve e medio termine sulla crescita corporea e lo sviluppo endocrino, riproduttivo, immunitario e/o nervoso di tali composti. Gli studi vengono effettuati su roditori esposti in fasi vulnerabili a disturbi della funzione tiroidea (sviluppo pre- e postnatale) a livelli di dose che non inducono tossicità evidente. Il meccanismo di eventuali effetti osservati, in particolare l'eventuale interazione con recettori nucleari, verrà chiarito mediante opportuni saggi *in vitro*, in collaborazione con gli altri enti coinvolti.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione degli effetti endocrini di contaminanti alimentari selezionati con particolare riguardo per lo sviluppo pre- e postatale

Ottimizzazione di modelli sperimentali integrati *in vivo/in vitro* per la valutazione di possibili effetti endocrini di contaminanti alimentari.

Trasferibilità dei risultati

Contributo alla valutazione del rischio di contaminanti selezionati

Identificazione di possibili biomarcatori da utilizzare nella sorveglianza sanitaria dell'esposizione ai contaminanti in esame

Evoluzione molecolare e antigenica di ceppi di rotavirus di origine umana e animale

I *rotavirus* sono classificati in gruppi A-E, distinti tra loro antigenicamente e per la specificità di ospite, più o meno ristretta nei diversi casi. I ceppi di gruppo A comprendono la quasi totalità dei *rotavirus* circolanti nell'uomo, ove causano diarrea grave specialmente nel

bambino, e larga parte dei ceppi presenti nelle specie animali da reddito, inclusi in particolare bovini e suini. Il potenziale evolutivo dei rotavirus dei *rotavirus A* è enorme ed è legato al genoma segmentato, che aggiunge lo scambio di segmenti genomici ai normali eventi di mutazione e ricombinazione. Questo è anche alla base della capacità di adattamento di ceppi virali propri di una specie a un ospite diverso, e pone problemi in particolare per la possibilità di trasmissione zoonotica di nuovi ceppi all'uomo. Il progetto si propone di valutare le differenze antigeniche e molecolari tra rotavirus di diversa origine, in particolare di genotipo G9, G5, G6, G8, G10 and P[1], P[5-7], P[11] prevalenti in diverse specie animali e ritrovati saltuariamente anche in casi di diarrea nell'uomo. Lo studio, già in atto nel 2005, viene condotto in collaborazione con l'Università di Bari, Facoltà di Medicina veterinaria, e con i laboratori del *National Institute of Health, USA*. Lo studio viene svolto attraverso lo studio di filogenesi degli isolati, e attraverso la tipizzazione molecolare e antigenica dei ceppi anche attraverso lo sviluppo di nuovi reagenti immunologici, specifici per diversi sierotipi.

Risultati attesi nel triennio

Saranno descritte le caratteristiche genomiche, anche attraverso analisi di sequenza, di ceppi di *rotavirus* animali e umani, identificati attraverso attività di sorveglianza esistenti sia in campo umano che veterinario. I dati ottenuti saranno impiegati per la costruzione di *database* di sequenza, su cui effettuare le analisi di evoluzione filogenetica dei ceppi virali, al fine di identificare eventuali meccanismi probanti la trasmissione zoonotica dell'infezione. Saranno sviluppati cloni di ibridoma in grado di produrre anticorpi monoclonali specifici per sierotipi virali di interesse, al fine di correlare le osservazioni di evoluzione genetica dei virus con modificazioni della reattività antigenica degli stessi. Per valutare il ruolo specifico di alcune proteine capsidiche, in particolare VP8 e VP4, nella protezione e nella specificità di ospite, verranno utilizzati peptidi ricombinanti espressi da cloni già in parte elaborati. Parallelamente, sarà clonata ed espressa la proteina non-strutturale NSP4, ipotizzata essere una enterotossina, per verificare eventuali differenze nell'attività della stessa in funzione del corrispondente ceppo virale umano o animale. A tale fine, saranno effettuati esperimenti *in vivo* in un modello di diarrea nel topo lattante e *in vitro* impiegando sia colture di cellule convenzionali o polarizzate.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto fornirà nuovi dati sulla circolazione di ceppi di *rotavirus* non convenzionali in Italia, e consentirà di valutare se e in che misura rotavirus di origine animale possono rendersi responsabili del salto di specie, in particolare riguardo alla trasmissione all'uomo. Questi dati consentiranno di mettere in evidenza i rischi eventuali legati al contatto con animali, in particolare quelli da reddito, alla contaminazione ambientale e al successivo sviluppo e ingresso di ceppi e sierotipi di rotavirus non convenzionali nella catena alimentare. I dati ottenuti saranno resi disponibili alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni su riviste specializzate, convegni e *workshop*. Lo studio, svolto in collaborazione con l'NIH, servirà a sviluppare i rapporti e gli scambi tra le due istituzioni.

Eziopatogenesi delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) degli animali

Eziologia – Uno degli aspetti più rilevanti nell'eziologia delle EST è l'esistenza di diversi ceppi di agente. È noto infatti che gli agenti delle EST hanno caratteristiche differenti gli uni dagli altri, anche in termini di patogenicità. Tra le EST animali, ad esempio, l'agente della scrapie ovina sembrerebbe non essere patogeno per l'uomo, come lo è invece quello della BSE. Contribuire a definire le basi molecolari della cd. *strain diversity* e delle differenze tra l'agente della scrapie e quello della BSE rappresenta uno degli obiettivi dell'attività di ricerca.

Patogenesi – Gli studi di patogenesi avranno come obiettivi quelli di contribuire a chiarire le basi biologiche e molecolari della cd. "barriera di specie", di definire i determinanti genetici

responsabili della suscettibilità/resistenza alle EST e infine di individuare i potenziali fattori esogeni coinvolti nella patogenesi delle EST. Nell'ambito di un progetto di studio sulla scrapie ovina, verranno inoltre condotti studi volti a verificare in condizioni sperimentali l'effettiva resistenza alla malattia da parte di certi genotipi ovinii apparentemente refrattari in condizioni naturali. Nell'ambito dello stesso progetto verrà studiato il pattern di espressione genica in tessuti di pecore infette per identificare nuovi geni coinvolti nelle fasi precoci dell'infezione, aprendo la strada in tal modo anche all'identificazione di nuovi *marker* diagnostici.

Diagnosi – La ricerca in questo ambito avrà come obiettivi lo sviluppo di sistemi di diagnosi precoce, nonché di tecniche per distinguere l'agente della BSE da quello della scrapie. A livello europeo si teme infatti che l'agente della BSE possa essere giunto, attraverso i mangimi contaminati, anche alle popolazioni ovi-caprine dove possa circolare – non riconosciuto - mimando clinicamente la scrapie.

Modelli animali – Un aspetto particolarmente critico della ricerca sulle EST è dato dai limiti dei modelli animali attualmente disponibili. In particolare, il topo rappresenta la specie impiegata per gli studi di trasmissione, per la determinazione dell'infettività di matrici biologiche e per la caratterizzazione dei ceppi. Questa specie tuttavia presenta una suscettibilità piuttosto bassa agli agenti delle EST. Sulla base di risultati preliminari di alcuni studi da noi condotti, verrà sviluppato un modello animale, basato su una specie di roditore selvatico (*Clethrionomys glareolus*), che ha mostrato una suscettibilità estremamente più elevata alla scrapie rispetto al topo.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di sistemi di caratterizzazione molecolare e biologica (*in vivo*) in grado di distinguere i diversi ceppi di prioni.

Sviluppo di sistemi rapidi di discriminazione dell'agente della scrapie da quello della BSE.

Definizione, su modelli animali da laboratorio, delle basi molecolari della "barriera di specie".

Definizione del ruolo del gene della PrP e delle sue varianti polimorfiche nella suscettibilità genetica delle EST animali.

Sviluppo, messa a punto, verifica di campo e validazione di metodiche di diagnosi precoce delle EST animali.

Sviluppo e caratterizzazione di un modello animale più suscettibile alle EST rispetto a quelli attualmente in uso, per studi di trasmissione, infettività e caratterizzazione di ceppi di agente.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale e internazionale attraverso la produzione di *report* e di pubblicazioni scientifiche.

I risultati di carattere applicativo verranno resi disponibili al Ministero della Salute e al SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle EST.

I protocolli diagnostici e i modelli animali sviluppati verranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale.

Malattia celiaca: Meccanismi di tossicità dei cereali tossici per i celiaci. Sorveglianza Nazionale delle complicanze

La malattia celiaca è un'intolleranza alimentare permanente nei confronti della frazione prolaminica contenuta in alcuni cereali (in particolare frumento, segale, orzo), in grado di determinare, in soggetti geneticamente predisposti, un danno della mucosa dell'intestino tenue sotto forma di atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrato linfocitario intraepiteliale. Tali alterazioni determinano la comparsa di malassorbimento, che può essere manifesto con la tipica diarrea e perdita di peso, subclinico con sintomi atipici (fra cui stipsi e dispepsia) ed

extraintestinali (anemia sideropenica o da carenza di acido folico, osteoporosi, poliabortività) e sempre più spesso del tutto silente sul piano clinico. La dieta senza glutine porta alla normalizzazione della mucosa intestinale consentendo un regolare assorbimento dei nutrienti e la maggior parte dei celiaci, a patto di osservare strettamente tale dieta, possono condurre una vita regolare senza alcun tipo di complicanze. Peraltro, la mancata diagnosi o la diagnosi tardiva espongono i pazienti al rischio di sviluppare patologia autoimmune e idiopatica a carico del sistema nervoso centrale e periferico, dell'apparato cardiocircolatorio, del sistema nervoso centrale e periferico, dell'apparato cardiocircolatorio, del sistema endocrino, del fegato e della cute, nonché complicanze quali severe alterazioni della parete intestinale (digiunoleite ulcerativa e sprue collagenosica) o quadri di scarsa, o assente risposta alla dieta (celiachia refrattaria) e insorgenza di neoplasie, in particolare linfoma non Hodgkin a livello intestinale e varie forme di eteroplasia epiteliale dell'apparato gastroenterico. Sebbene, in passato, sia stata inclusa dalla legislazione italiana fra le malattie rare, la celiachia è una malattia molto frequente con una prevalenza negli studi su popolazione generale di 1 caso ogni 100 abitanti, ma purtroppo ancora poco diagnosticata dal momento che in Italia il numero dei casi identificati si aggira sui 50.000 a fronte di una stima almeno 9 volte superiore. Alla luce di questi dati è evidente l'importanza di incrementare il trend diagnostico e soprattutto la diagnosi precoce che è in grado di prevenire le complicanze.

Recentemente la legge del 4 luglio 2005 n. 123 introduce novità nell'ambito dell'assistenza ai soggetti celiaci, definendo la celiachia una malattia sociale e affidando all'Istituto Superiore di Sanità importanti compiti di coordinamento, sottolineando la necessità di migliorare le condizioni sociali degli individui che ne sono affetti.

In particolare all'art. 3 della suindicata Legge, è specificato che l'Istituto dovrà intervenire per quanto concerne: a) la definizione di un programma articolato che permetta di assicurare la formazione e l'aggiornamento professionale della classe medica sulla conoscenza della malattia celiaca; b) la prevenzione delle complicanze e monitorare le patologie associate alla malattia celiaca; c) definire i *test* diagnostici e di controllo per i pazienti affetti da morbo celiaco.

Inoltre la Consulta Scientifica per la Sicurezza Alimentare, prendendo atto che presso l'Istituto Superiore di Sanità, da alcuni anni, è attivo un Registro al quale affluiscono dati da parte di Centri che hanno aderito volontariamente all'invio di documentazione relativa alle complicanze, auspica di rendere obbligatorio l'invio dei dati da parte dei Centri di riferimento di ciascuna Regione all'Istituto Superiore di Sanità, che avrà compiti di Coordinamento nazionale e tenuta del Registro.

Per quanto la celiachia rappresenti una patologia congenita, la maggior parte delle complicanze si manifesta in età post-adolescenziale e, pertanto una corretta valutazione della prognosi della malattia, necessita dello studio delle suddette complicanze. A tutt'oggi non esistono studi prospettici su campioni di grandi dimensioni volti alla definizione della incidenza di complicanze e della sopravvivenza dei celiaci.

Risultati attesi nel triennio

L'Istituto Superiore di Sanità intende realizzare, avvalendosi della collaborazione dei Centri di riferimento, uno studio sulla incidenza delle complicanze e sulle cause di mortalità che abbia i seguenti obiettivi:

Determinazione della incidenza delle complicanze della celiachia in età adulta e in particolare dei linfomi a cellule T e delle neoplasie epiteliali del tratto digerente

Determinazione della incidenza di neoplasie di qualsiasi tipo nei pazienti celiaci in età adulta

Determinazione della mortalità e delle relative cause nei pazienti celiaci in età adulta

Individuazione di eventuali correlazioni tra alcune variabili (età della diagnosi, compliance alla dieta priva di glutine, ecc.) e l'incidenza delle complicanze

Stima della sopravvivenza e valutazione dei fattori prognostici

Inoltre in considerazione dell'importanza della patologia si intende proseguire le ricerche, con i seguenti obiettivi:

valutazione della attività protettiva di un peptide di 10aa P.M. "1156", (Brevetto ISS n. 0876399), estratto dal frumento duro, nei confronti della tossicità del glutine sulla mucosa intestinale di soggetti celiaci;

identificazione di varietà di cereali disponibili sul mercato, non tossiche per i celiaci;

capacità di alcune endopeptidasi batteriche di detossificare la proteina tossica per i celiaci

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno trasferiti al Servizio Sanitario Nazionale.

Modelli di interazione tra sostanze naturali presenti negli alimenti e contaminanti

Lo studio ha l'obiettivo di valutare il ruolo di fitoestrogeni, in particolare il resveratrolo, fitoestrogeno appartenente alla famiglia degli stilbeni e presente ad alti livelli nel vino rosso e nella frutta secca e con spiccate proprietà antiossidanti, nella modulazione della cito- e genotossicità di contaminanti associati all'alimentazione e agli stili di vita. In particolare verrà considerato il fumo di sigaretta, come miscela complessa di sostanze in grado di indurre *stress* ossidativi anche mediante la interazione con recettori nucleari (ad es., IPA, diossine, cadmio).

La modulazione da parte del resveratrolo degli effetti citotossici e sull'integrità del ciclo cellulare e dei meccanismi di riparo del DNA verrà misurata studi *in vitro* condotti su linee cellulari derivanti da tessuti originanti da foglietti embrionali diversi, quali, ad esempio, neuroblasti e fibroblasti. Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, verranno effettuati studi di tossicità *in vivo* su animali esposti in fasi particolarmente suscettibili (sviluppo pre- e postatale).

Risultati attesi nel triennio

Identificazione e valutazione delle possibili interazioni tra fitoestrogeni naturalmente presenti negli alimenti e contaminanti associati all'alimentazione e agli stili di vita.

messa a punto di modelli sperimentali per la valutazione di possibili interazioni fra composti bioattivi presenti nella dieta e xenobiotici

Trasferibilità dei risultati

Contributo alla definizione di linee guida/indicazioni su stili di vita e abitudini alimentari che possano risultare protettivi per la salute umana.

ReProTect

Il Progetto Integrato ReProtect (priorità 1 "Scienze della Vita e Biotecnologie") finanziato nell'ambito del 5° Programma Quadro, si prefigge la elaborazione e validazione di una batteria integrata ed efficiente di *test in vitro* per lo *screening* dei composti chimici con possibili effetti sulla riproduzione, l'embriogenesi o il sistema endocrino, in modo da sostenere la realizzazione di politiche europee sul rischio chimico, in particolare REACH.

L'ISS coordina il *WorkPackage IV* ("*cross-cutting technologies*") che si prefigge di sviluppare e valicare quegli approcci tecnologicamente avanzati (post-genomica, sistemi di attivazione metabolica, QSAR, sistemi per valutare la attivazione recettoriale) che possono potenziare la sensibilità di sistemi *in vitro*. In particolare, l'ISS svilupperà e validerà la tossicogenomica nel campo degli Interferenti Endocrini

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di RNA *microarray* per la valutazione di potenziali interferenti endocrini

caratterizzazione di marcatori molecolari per sostanze che interagiscono con i recettori per gli ormoni steroidi

Contributo alla definizione di una strategia integrata per la valutazione della tossicità riproduttiva di sostanze chimiche

Trasferibilità dei risultati

Approcci tossicogenomici utilizzabili da industrie e laboratori pubblici per la identificazione di potenziali interferenti endocrini

Marcatori molecolari utilizzabili per la sorveglianza dell'esposizione

Riferibilità delle misure nel settore della sicurezza alimentare e della prevenzione delle patologie umane: sviluppo e promozione degli strumenti per la sua attuazione in settori specialistici della medicina di laboratorio

La qualità dei risultati di analisi di laboratorio può essere determinante sia per il percorso decisionale riguardo ad una particolare patologia sia per la prevenzione delle malattie. Le norme ISO/IEC 17025 e ISO 15189 richiedono che i laboratori dimostrino la riferibilità delle proprie misurazioni. Migliorare la riferibilità delle misure in medicina di laboratorio è un obiettivo perseguito dalle organizzazioni internazionali di metrologia (CGPM, OILM) e di normazione (ISO, CEN, UNI), OMS e IFCC, anche con l'attività del *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM)*, un comitato congiunto tra le parti interessate. Scopo del progetto è realizzare interventi mirati allo sviluppo della riferibilità nel settore della medicina preventiva, inclusa la prevenzione dei rischi derivanti dall'alimentazione, potenziando e sostenendo le esperienze già presenti nel Ssn, e, in particolare, sviluppando:

metodi di riferimento (ISO 15198) e partecipazione alle attività del JCTLM

procedure applicative per la stima dell'incertezza di misura

aspetti specifici di programmi di valutazione esterna di qualità in corso (nuovi analiti; produzione di materiali (ISO Guide 34); incertezza dei valori attesi; gestione dei risultati; e valutazione delle prestazioni dei laboratori (ISO 13528:2005); nuovi sviluppi della tecnologia dell'informazione

traguardi analitici armonizzati attraverso la collaborazione internazionale

formazione in campo metrologico nel settore specifico.

Risultati attesi nel triennio

Metodi di riferimento validati anche attraverso attività di confronto internazionali per la determinazione di xenobiotici in fluidi biologici

Documenti e linee guida sulle metodologie per la validazione dei metodi analitici, la dimostrazione della riferibilità e la stima dell'incertezza di misura per la determinazione di indicatori biologici e fattori predittivi

Definizione e pubblicazione di esempi di procedure per la stima dell'incertezza di misura per alcune tipologie analitiche

Valutazione della fattibilità di programmi di valutazione esterna di qualità per nuovi analiti

Materiali di riferimento caratterizzati in termini di riferibilità e incertezza di misura

Implementazione e valutazione della gestione dei risultati in accordo alla norma ISO 13528

Produzione di dati obiettivi sull'incertezza di misura associata alle determinazioni di alcuni analiti in confronto con altre esperienze internazionali

Traguardi analitici armonizzati per xenobiotici e altri indicatori biologici

Realizzazione di eventi formativi specifici

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazione su riviste specializzate di settore e/o altri mezzi di informazione (Siti *web*) dei metodi di riferimento validati

Diffusione dei documenti, linee guida e esempi operativi per la validazione dei metodi analitici, la dimostrazione della riferibilità e la stima dell'incertezza di misura attraverso

pubblicazione su riviste e diffusione attraverso siti web istituzionali e di organizzazioni internazionali

Materiali di riferimento certificati per la realizzazione di catene della riferibilità a campioni primari

Metodologie applicative per la gestione dei dati di programmi di valutazione esterna di qualità

Disponibilità di metodologie didattiche e pacchetti formativi per la formazione continua in campo metrologico

**SAFEFOODERA: un programma europeo per la sicurezza alimentare
(Food safety-forming a European platform for protecting consumers
against health risks)**

Fra gli obiettivi del Sesto Programma Quadro Europeo 2002—06 (6FP), vi sono quelli di rafforzare il coordinamento delle attività nazionali in vari settori, tra cui la sicurezza alimentare, sostenere lo sviluppo coerente delle attività di ricerca e incentivare l'innovazione. In tale contesto, e sulla base dell'esperienza di molti gruppi di ricerca di alcuni paesi europei afferenti a più "consorzi", è stato dato vita a un SAFEFOODERA è un progetto di azione coordinata, nell'ambito dello schema ERA-NET, settore *Life Sciences*, che ha avuto inizio nell'agosto del 2004, e i cui obiettivi prioritari sono:

contribuire alla ricerca nel settore della sicurezza alimentare attraverso il coordinamento delle ricerche regionali e nazionali;

facilitare nell'UE lo scambio trans-nazionale di informazioni tra i consumatori e le altre parti, pubbliche o private;

sviluppare approcci coordinati per la condivisione di informazioni su valutazione, gestione e comunicazione del rischio;

individuare quali strutture dell'UE svolgono già ricerche significative in questo settore e quali strutture, nei singoli stati membri, abbiano il compito istituzionale di emanare bandi di ricerca e/o di erogare fondi nel settore della sicurezza alimentare;

trasferire le informazioni tecnico-scientifiche raccolte verso le diverse strutture dell'UE che si occupano di sicurezza alimentare;

definire i criteri per individuare gli argomenti di ricerca primari da sviluppare;

sviluppare progetti di ampio respiro che possano riunire le risorse già disponibili allo scopo di evitare dispersioni e duplicazioni.

Risultati attesi nel triennio

Del consorzio SAFEFOODERA fanno parte le strutture nazionali di riferimento di 15 paesi membri dell'UE, 3 paesi associati e 2 organizzazioni sopranazionali. L'Istituto Superiore di Sanità, individuato come struttura scientifica di riferimento per l'Italia, dovrà rispondere all'esigenza di raccordare i tanti gruppi italiani operanti sul territorio nazionale che, avendo sviluppato da tempo progetti in materia di sicurezza alimentare, potranno ottenere una maggiore visibilità del loro operato a livello comunitario e quindi avere maggiori probabilità che il loro lavoro venga pienamente riconosciuto. Le attività svolte a livello nazionale nell'ambito del progetto SAFEFOODERA rappresentano un primo passo per definire un quadro delle attività di ricerca svolte nel settore della qualità e della sicurezza alimentare nel nostro paese. L'azione coordinata SAFEFOODERA, nata con l'intento di rafforzare il coordinamento e sostenere lo sviluppo coerente di politiche e attività di ricerca nel settore della sicurezza alimentare a livello europeo, contribuirà, fornendo lo stato dell'arte in quest'ambito, a migliorare la gestione dei rischi alimentari.

Trasferibilità dei risultati

Effettuata una prima ricerca sui siti web istituzionali degli enti responsabili a livello nazionale dei finanziamenti in campo di sicurezza alimentare. I 162 progetti finanziati in Italia riguardano tutti i temi ritenuti prioritari nell'ambito di SAFEFOODERA, tra cui: i rischi emergenti, l'analisi del rischio, i rischi sanitari da contaminanti naturali o ambientali negli alimenti e la catena alimentare, l'armonizzazione delle attività di prova e la tracciabilità dei risultati di misura, il controllo degli agenti microbiologici patogeni. L'approccio multidisciplinare dei progetti di ricerca è testimoniato dall'ampio ventaglio delle competenze coinvolte che spaziano da discipline sociali, quali le scienze sociali e l'economia, a discipline tecnico-scientifiche quali l'informatica, la statistica e la modellistica, la metrologia, la tossicologia sperimentale, la chimica analitica, la genetica dei microrganismi, a discipline "emergenti" quali la genomica, la proteomica, la metabolomica e la metabonomica, a discipline più propriamente mediche quali l'epidemiologia umana, e lo studio delle patologie umane atopiche e immunologiche.

Sorveglianza e controllo delle zoonosi trasmesse da alimenti

Il progetto si propone di coordinare le attività di ricerca e sorveglianza sulle infezioni da *Escherichia coli* O157 e altri *E. coli* verocitotossina produttori (VTEC) esistenti attualmente in Italia in campo epidemiologico, microbiologico e veterinario. Saranno effettuati studi sulla prevalenza nelle popolazioni animali e nei prodotti di origine animale, acquisendo le informazioni di base per tracciare le principali vie di trasmissione dell'infezione lungo la filiera di produzione degli alimenti. La tipizzazione molecolare dei ceppi isolati dalle diverse fonti sarà utilizzata come strumento principale per studiare le correlazioni epidemiologiche tra serbatoi animali, veicoli alimentari e episodi di malattia nell'uomo.

In generale, quest'attività di ricerca contribuirà ad alimentare l'attività istituzionale che l'ISS è chiamato a svolgere nel settore delle zoonosi e in particolare a:

migliorare la capacità di rispondere alla richiesta di supporto tecnico-scientifico che proviene dalle strutture del SSN.

individuare i punti della filiera produttiva degli alimenti di origine animale che, nella realtà italiana, risultano critici per la trasmissione all'uomo degli agenti zoonosi considerati.

migliorare la qualità della partecipazione italiana alle attività comunitarie di ricerca e sorveglianza sulle zoonosi.

Risultati attesi nel triennio

Proseguire l'attività di sorveglianza su base nazionale delle infezioni da VTEC per seguirne il trend d'incidenza e individuare sierogruppi patogeni più frequenti in Italia.

Approfondire le conoscenze sugli animali serbatoio di VTEC, con particolare attenzione alle specie animali non-ruminanti.

Valutare la prevalenza di infezione da VTEC nelle popolazioni animali e nei prodotti di origine animale.

Valutare diversi metodi per la tipizzazione molecolare di VTEC per studiare le correlazioni epidemiologiche tra serbatoi animali, veicoli alimentari e episodi di malattia nell'uomo.

Acquisire informazioni di base per individuare i punti della filiera produttiva degli alimenti di origine animale che, nella realtà italiana, risultano critici per la trasmissione all'uomo delle infezioni da VTEC.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale attraverso la produzione di *report* e di pubblicazioni scientifiche.

Le Procedure Operative redatte saranno disponibili per i laboratori del SSN.

I protocolli di campionamento potranno essere utilizzati dagli Uffici Competenti (Ministero della Salute, Regioni).

I protocolli di indagine epidemiologica verranno discussi e armonizzati con le Regioni.

Verranno organizzati *workshop* nazionali per la presentazione e discussione dei risultati ottenuti.

Studio biomolecolare degli agenti patogeni responsabili di infezioni batteriche a carattere zoonosico, oggetto di Profilassi di Stato negli animali di allevamento

La disponibilità di metodi specifici e sensibili per la diagnosi rapida delle malattie di maggiore rilevanza sanitaria nelle specie zootecniche, è un presupposto fondamentale per l'applicazione di qualsiasi intervento di profilassi pianificata. All'ISS è infatti richiesta, secondo le normative comunitarie e nazionali, l'attività di consulenza e controllo su tecniche diagnostiche, prodotti diagnostici e vaccini per le Profilassi di Stato. Pertanto il progetto si propone di sviluppare metodi rapidi di diagnosi che abbattano i tempi di risposta da parte del laboratorio e diano sufficienti garanzie di affidabilità in termini di riproducibilità e ripetibilità del dato, focalizzando l'attenzione sulle più importanti malattie infettive che interessano gli animali da allevamento, quali brucellosi e carbonchio ematico

Le fasi del progetto comprenderanno:

l'isolamento del patogeno da latte, sangue, feti, lochiazioni e organi animali e parallelamente l'analisi diretta delle meesime matrici con tecniche molecolari;

la messa a punto di metodi biomolecolari in grado di caratterizzare il ceppo patogeno (genere, specie, biotipo o sierotipo) e di differenziarlo da quello vaccinale;

lo studio della correlazione tra distribuzione della malattia nell'uomo e nella popolazione animale al fine di individuare i principali fattori di rischio per l'uomo;

lo studio dei principali geni coinvolti nella virulenza/attenuazione dei ceppi isolati;

lo studio della sensibilità agli antibiotici nei ceppi isolati sia dagli animali che dall'uomo e la caratterizzazione molecolare dei geni responsabili della resistenza agli antibiotici maggiormente utilizzati nella terapia medico-veterinaria.

Risultati attesi nel triennio

Lo sviluppo di tecniche molecolari in grado di differenziare specie, biotipo o sierotipo sfruttando il polimorfismo di alcuni geni, per esempio il gene *rpoB* codificante la subunità B della RNA polimerasi, e la loro comparazione con le metodiche fenotipiche ufficialmente riconosciute. Obiettivo del progetto sarà quello di offrire un valido strumento per la rapida identificazione e differenziazione degli isolati di Brucella: riduzione dei tempi di risposta, aumento dell'affidabilità e riproducibilità delle prove rispetto ai metodi tradizionali). Tali informazioni potranno così supportare i piani di controllo/eradicazione della brucellosi su base aziendale e territoriale e le indagine epidemiologiche sulla diffusione della malattia sia nell'uomo che negli animali al fine di individuare i principali fattori di rischio per l'uomo.

L'individuazione dei geni coinvolti nella patogenicità del microrganismo al fine di migliorare la comprensione del meccanismo di virulenza/attenuazione. Tali informazioni potrebbero essere utili nella formulazione di nuovi vaccini.

Il monitoraggio nel tempo e nello spazio dell'evoluzione della resistenza agli antibiotici la cui conoscenza permetterà di indirizzare la scelta terapeutica.

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 IZZSS e di altri enti pubblici o privati interessati:

stesura di protocolli e trasferimento delle conoscenze acquisite ai laboratori interessati (documenti, corsi di formazione, attivazione di servizi diagnostici dedicati);

elaborazione di manoscritti sulle metodiche utilizzate e i risultati ottenuti, da inviare per la relativa pubblicazione, a riviste di livello nazionale e internazionale.

Studio biomolecolare dell'interazione degli agenti patogeni responsabili di infezioni batteriche a carattere zoonosico, oggetto di Profilassi di Stato negli animali di allevamento, con l'ospite

La Profilassi di Stato per il controllo di importanti infezioni batteriche a carattere zoonosico quali brucellosi, carbonchio ematico e tubercolosi bovina, prevee, secondo le normative comunitarie e nazionali, l'attività di consulenza dell'ISS che permetta il controllo e la messa a punto di metodi diagnostici (microbiologici, immunologici e biomolecolari) specifici e sensibili utili ai fini della sorveglianza epidemiologica.

Il progetto si propone di sviluppare metodi molecolari per una rapida caratterizzazione del patogeno attraverso l'individuazione di specifici *marker* molecolari:

l'isolamento del patogeno da tessuti animali (latte, sangue e organi), umani (sangue) e da matrici alimentari (latte e i suoi derivati) con tecniche molecolari;

la messa a punto di metodi biomolecolari in grado di caratterizzare il ceppo patogeno (genere, specie, biotipo o sierotipo) e di differenziarlo da quello vaccinale;

lo studio della risposta dell'ospite all'infezione: individuazione di determinanti genetici responsabili della suscettibilità/resistenza all'infezione e studio quantitativo/qualitativo della loro espressione genetica durante le fasi dell'infezione mediante esperimenti *in vivo* e *in vitro*.

Risultati attesi nel triennio

Lo sviluppo di nuove strategie diagnostiche in grado di differenziare specie, biotipo o sierotipo sfruttando il polimorfismo di alcuni geni e la loro comparazione con le metodiche fenotipiche ufficialmente riconosciute;

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.

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 IZZSS e di altri Enti pubblici o privati interessati:

stesura di protocolli e trasferimento delle conoscenze acquisite ai laboratori interessati (documenti, corsi di formazione, attivazione di servizi diagnostici dedicati);

elaborazione di manoscritti sulle metodiche utilizzate e i risultati ottenuti, da inviare per la relativa pubblicazione, a riviste di livello nazionale e internazionale.

Studio dei fattori genetici coinvolti nel condizionare la suscettibilità dei piccoli ruminanti alle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) sono un gruppo di patologie neurodegenerative che comprendono, nell'uomo, la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ), la sua variante (vMCJ) eziologicamente correlata all'agente della BSE, negli animali la scrapie ovina, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e diverse altre forme descritte in specie domestiche e selvatiche. La suscettibilità alle EST è fortemente influenzata, nell'uomo e nelle pecore, 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 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 i determinanti genetici, responsabili della sensibilità e resistenza nei confronti delle EST.

Grande rilievo verrà posto all'indagine nei casi naturali di malattia sia nelle pecore che nelle capre del gene delle PrP per evidenziare i genotipi coinvolti nella malattia naturale al fine di controllare nel caso delle pecore l'eventuale differenziale *targeting* di focolai di malattia e nel caso delle capre di evidenziare quali sono gli alleli coinvolti nella suscettibilità/resistenza a tali malattie.

Verranno inoltre approfondite le conoscenze sulle basi genetiche di queste malattie studiando i *pattern* di espressione genica nei tessuti periferici di animali sperimentalmente infettati, indagando il coinvolgimento di nuovi geni nelle fasi precoci dell'infezione.

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 geni coinvolti nella patogenesi delle EST.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale e internazionale attraverso la produzione di *report* e di pubblicazioni scientifiche.

I risultati di carattere applicativo verranno resi disponibili al Ministero della Salute e al SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle EST.

Studio del ruolo del sistema immunitario sui meccanismi patogenetici delle infezioni dai batteri endocellulari facoltativi in grado di indurre una malattia di tipo cronico (Brucellosi) o acuto, a carattere setticemico (Salmonellosi)

I fenomeni immunitari che si realizzano successivamente a un'infezione sono spesso all'origine sia di meccanismi patogenetici che caratterizzano la malattia, sia di meccanismi protettivi messi in atto dall'organismo colpito. Lo studio di tali fenomeni rappresenta un essenziale approccio per la definizione di strategie più efficaci per il controllo delle malattie infettive.

In tale ambito, il progetto si propone:

di valutare il ruolo del sistema immunitario nei meccanismi che inducono la persistenza cronica di *Brucella spp* nei vertebrati;

di valutare alcuni meccanismi di virulenza di *Salmonella spp* e il ruolo del sistema immunitario nei meccanismi patogenetici dell'infezione.

Per ciò che attiene al punto 1, sulla base dei risultati ottenuti emerge che i meccanismi che regolano la persistenza del germe negli organismi ospite, siano in parte condizionati da una risposta immunitaria caratterizzata da un parziale controllo dello sviluppo del patogeno (Pasquali et al., 2003. *Infection and Immunity*, 71: 2326-30; Pasquali et al., 2002. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 491-2; Pasquali et al., 2001. *Infection and Immunity*, 69: 6541-4). Ciò rende quindi necessario caratterizzare meglio la risposta immunitaria, individuando quei fattori coinvolti nella persistenza del germe.

Per ciò che attiene al punto 2, si sono condotti alcuni studi pilota per valutare il ruolo patogenetico dei geni che codificano per l'enzima superossido dismutasi (SOD) (Ammendola et al., 2005. *Microbes and Infection*, 7: 698-707). Al momento, sono in corso studi volti a

caratterizzare gli aspetti meccanicistici del ruolo dei geni SOD e il ruolo del gene che codifica l'enzima deputato all'utilizzo dello zinco (ZNUa), nei meccanismi di virulenza.

Risultati attesi nel triennio

In relazione alle linee di indirizzo enunciate, gli obiettivi da perseguire per il triennio 2006-2008 possono essere così rappresentati:

individuazione del meccanismo che condiziona la cronicità dell'infezione brucellare, con particolare riferimento al ruolo delle cellule immunitarie ad attività immunomodulante (linfociti T CD4+CD25+);

valutazione del ruolo dei fattori di virulenza studiati nella patogenesi della *Salmonella spp.*;

individuazione della possibilità di utilizzare ceppi di *Salmonella* a patogenicità attenuata a scopo vaccinale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenibili potranno servire per perfezionare le nostre conoscenze in merito agli effetti dei batteri endocellulari facoltativi in grado di indurre una malattia di tipo cronico (Brucellosi) o acuto, a carattere setticemico (Salmonellosi). Questi dati potranno essere utilizzati per definire protocolli di intervento volti a una maggiore efficacia nel controllo dei patogeni.

In aggiunta, la comprensione del ruolo dei meccanismi di virulenza potrebbe fornire un interessante approccio per la valutazione di nuovi approcci vaccinali.

Studio della interazione genotipo-ambiente nella patogenesi della adrenoleucodistrofia

L'adrenoleucodistrofia (ALD) è una malattia genetica che causa una grave demielinizzazione del sistema nervoso centrale. Esistono diverse varianti cliniche che non correlano con il genotipo, ovvero con il tipo di mutazione del gene ABCD responsabile della patologia. Dal momento che anche gemelli identici possono manifestare differenti fenotipi clinici, si ritiene che alcuni fattori ambientali debbano avere un ruolo nel decorso clinico. In effetti dopo la mappatura del genoma umano il passo successivo della ricerca dovrebbe essere proprio la comprensione del ruolo della interazione di fattori ambientali e genotipo nell'espressione del fenotipo. Il presente progetto si propone di studiare questo aspetto della patologia utilizzando un modello cellulare geneticamente modificato. Dal momento che la patologia colpisce il sistema nervoso saranno utilizzate cellule gliali di ratto, in cui il gene ABCD verrà inattivato mediante la tecnica di interferenza dell'RNA (*RNA-interference*).

Risultati attesi nel triennio

Con la tecnica di *RNA interference* e utilizzando appropriati vettori si potranno ottenere cellule permanentemente modificate e quindi utilizzabili per tempi lunghi. Come fattore ambientale in grado di condizionare il decorso della malattia verrà analizzato inizialmente il ruolo dello stress ossidativo. Infatti, la possibilità del suo coinvolgimento nella patologia era stato già messo in luce dai nostri precedenti studi sia *in vitro* che *ex vivo* sui pazienti. Se questa ipotesi neuro-patogenetica verrà confermata, si valuterà anche l'efficacia di sostanze antiossidanti al fine di saggiare la possibilità di nuovi approcci terapeutici, dal momento che attualmente non esistono interventi efficaci per bloccare o prevenire la progressione della malattia.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio della funzione del gene ABCD contribuirà ad identificare nuovi *target* per la terapia dell'ALD. La collaborazione scientifica con l'ospedale pediatrico Bambino Gesù che possiede una numerosa casistica della malattia, consentirà il trasferimento sull'uomo delle ipotesi avvalorate dai risultati che si otterranno. Ciò potrà essere realizzato con studi epidemiologici o

con l'individuazione di nuovi parametri biologici indicativi del coinvolgimento dello *stress* ossidativo nei diversi fenotipi della malattia

Sviluppo di modelli *in vivo* e *in vitro* per lo studio della “barriera di trasmissione” nella trasmissione interspecifica delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST)

La trasmissione in animali da laboratorio costituisce ancora uno strumento indispensabile per lo studio delle EST. Il topo da laboratorio è la specie tradizionalmente impiegata a tale scopo. Questo modello, tuttavia, appare non essere adeguatamente suscettibile alle malattie da prioni: gli esperimenti di trasmissione non sono sempre coronati da successo e i tempi di incubazione sono sempre estremamente lunghi, spesso superiori ai due anni. I risultati di un progetto di ricerca coordinato dall'ISS e finanziato dall'UE hanno consentito di sviluppare un nuovo modello animale, l'arvicola rossastra (*Clethrionomys glareolus*), per gli studi di trasmissione delle EST. I risultati degli studi sinora condotti indicano che la suscettibilità di tale modello risulta analoga o superiore a quella dei topi transgenici esprimenti la proteina prionica (PrP) della specie che contrae l'infezione e indicano l'arvicola come il modello suscettibile alle più ampia varietà di malattie da prioni umane e animali. I promettenti risultati ottenuti dal progetto hanno consentito, nell'ambito di un ulteriore progetto finanziato dall'UE, di programmare l'ampliamento degli studi di trasmissione sul modello animale e lo sviluppo, su tale base, di modelli di conversione *in vitro* di PrP ricombinante in PrPSc, di modelli di “amplificazione” della PrPSc attraverso la tecnica denominata *protein misfolded cyclic amplification* o PMCA, recentemente sviluppata e di linee cellulari transfettate con il gene dell'arvicola.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo del progetto è lo sviluppo di sistemi *in vivo* e *in vitro* in grado di “modellare” in maniera fedele e rapida la “barriera di trasmissione” esistente nella trasmissione delle malattie da prioni da una specie all'altra. Tali modelli saranno di grande aiuto nello studio delle basi molecolari della “barriera di trasmissione” e nella definizione del rischio di trasmissione all'uomo delle malattie da prioni degli animali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale e internazionale attraverso la produzione di *report* e di pubblicazioni scientifiche.

I risultati di carattere applicativo verranno resi disponibili al Ministero della Salute e al SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle EST.

I modelli *in vivo* e *in vitro* sviluppati verranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale.

Tecniche di rilevamento dei virus influenzali in matrici ambientali

Studi epidemiologici condotti dalla fine degli anni '70 hanno evidenziato quanto il *pool* dei virus influenzali fosse vasto e quanto vasta la variabilità antigenica nelle popolazioni di uccelli selvatici. L'importanza degli uccelli acquatici è legata non solo all'entità dei *pool* virali che essi ospitano, ma anche alla rapida disseminazione di questi virus a grandi distanze, a causa delle abitudini migratorie e del comportamento gregario di tali specie.

Annualmente, prima della migrazione, gli uccelli acquatici si aggregano in gruppi estremamente numerosi, generalmente sui laghi. Negli anatidi, i virus influenzali replicano in prevalenza nelle cellule dell'epitelio intestinale e sono escreti in elevate concentrazioni nelle feci, senza causare malattia. Virus influenzali appartenenti a diversi sottotipi sono stati isolati da feci fresche e da acqua di lago non concentrata; attraverso le feci deposte nell'acqua, il virus

trova un modo estremamente efficiente per trasmettersi tra uccelli acquatici. Successivamente, durante la stagione autunnale, le giovani anatre recettive, nel periodo di aggregazione prima della migrazione, possono infettarsi con i virus influenzali eliminati nelle acque.

Inoltre la trasmissione mediante le feci fornisce al virus influenzale, tramite le anatre in migrazione, un mezzo di diffusione ad altri uccelli domestici e selvatici.

Risultati attesi nel triennio

In considerazione del rischio legato alla escrezione e trasmissione dei virus influenzali da uccelli acquatici, sarà possibile valutare la diffusione dei virus influenzali nelle acque di superficie in zone umide considerate a maggiore rischio di contaminazione da uccelli migratori infetti.

Trasferibilità dei risultati

Definizione di tecniche di prelievo da matrici ambientali (acque di superficie) per la ricerca virologica

- preparazione dei campioni con metodi colturali

- identificazione virale con tecniche immunologiche

- identificazione e quantificazione di campioni contenenti virus influenzali mediante tecniche biomolecolari (RRT-PCR per la quantificazione della carica virale e sequenziamento dei geni di interesse

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. Purtroppo tali caratteristiche permettono la tipizzazione molecolare solo di una piccola parte dei ceppi di EST circolanti. 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. 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. 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. Il presente progetto si propone di caratterizzare i ceppi di EST presenti nei ruminanti di interesse zootecnico e nell'uomo al fine di rintracciare ceppi potenzialmente zoonotici.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di raggiungere i seguenti obiettivi:

- Mettere a punto protocolli di tipizzazione molecolare e biologica per la discriminazione della scrapie e della BSE in ovi-caprini

- 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 della Salute e al 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 e BSE nella pecora:
studio della patogenesi della Scrapie e della BSE nei piccoli ruminanti
e 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 2006-2008 è incentrata sullo studio della patogenesi sperimentale della scrapie e della BSE 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. 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. In particolare la patogenesi verrà studiata in pecore con diverso genotipo della proteina prionica sacrificate in momenti successivi durante l'incubazione della malattia dopo infezione per via orale. Il percorso patogenetico dell'agente infettante verrà tracciato utilizzando la PrPSc (proteina prionica patologica) come *marker* di infezione. Le cellule direttamente coinvolte nella replicazione dei prioni verranno inoltre individuate mediante tecniche di immunoistochimica. La quantità di infettività accumulata da diversi tessuti verrà inoltre misurata tramite *bioassay*, fornendo così le basi per una valutazione quantitativa del rischio derivante dal consumo di diversi tessuti ovisini infetti. 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 ovisini, 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

Nello specifico, il programma si propone di:

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

modulare la risposta immunitaria per identificare le componenti del sistema immunitario coinvolte nella patogenesi delle EST

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

Valutazione degli effetti degli acidi grassi esogeni sullo sviluppo cerebrale in modelli sperimentali

È particolarmente diffuso fra l'alimentazione della prima infanzia l'uso di formule, miscele di nutrienti alternative al latte materno. Attualmente non è ancora stato stabilito con sicurezza la composizione in acidi grassi più idonea per il normale sviluppo del neonato. In commercio, tuttavia, vi sono delle miscele di latte artificiale arricchite in acido arachidonico, docosaesaenoico e eicosapentaenoico, carenti nel latte di mucca, ma presenti in quello materno. Una attenta valutazione degli acidi grassi, quindi, è necessaria in quanto i lipidi della dieta possono influenzare lo sviluppo del cervello il cui processo di formazione al momento della nascita non è ancora completo.

Il nostro obiettivo è quello di valutare in studi *in vitro* e *in vivo* gli effetti degli acidi grassi poliinsaturi sullo sviluppo del cervello.

In un modello cellulare, da noi preesistentemente allestito, costituito da cellule gliali di ratto transfettate con i vettori d'espressione contenenti le sequenze nucleotidiche regolatrici dell'espressione dei geni della mielina (Salvati et al. *Neurochem.Intern.* 2004;44:331-8.), si identificheranno gli acidi grassi in grado di modulare tali geni. Successivamente, si verificherà in ratti neonati l'effetto sul processo di mielinogenesi degli acidi grassi che *in vitro* sono stati in grado di *up-regulate* l'espressione dei geni della mielina.

In modelli sperimentali di demielinizzazione si studierà la capacità di riparo degli acidi grassi sulla mielina.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione della composizione degli acidi grassi poliinsaturi e del rapporto n-6/n-3 nelle "formule" più idonea allo sviluppo cerebrale.

Individuazione dei fattori di rischio presenti nell'alimentazione della prima infanzia responsabili di patologie che compaiono nel corso della vita.

Individuazione degli acidi grassi in grado di attivare e potenziare i circuiti coinvolti nel processo di mielinogenesi

Identificazione di molecole in grado di innescare il processo di rimielinizzazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati finali saranno compendati in pubblicazioni internazionali e trasferiti al SSN

Virulotyping di patogeni enterici, in particolare di salmonella, VTEC, Campylobacter

Gli stipiti di *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC), *Salmonella* e *Campylobacter* sono importanti patogeni trasmessi all'uomo attraverso il consumo di alimenti contaminati.

Le infezioni sostenute da questi microrganismi possono indurre gravi patologie e sono una importante causa di mortalità infantile sia nei paesi industrializzati che in via di sviluppo.

L'identificazione dei nuovi patotipi è essenziale per lo sviluppo di strategie di intervento per il controllo delle infezioni.

Questa attività, è l'argomento di un progetto, già approvato, che sarà finanziato nell'ambito del *Network* d'eccellenza per la prevenzione e il controllo delle zoonosi (ME-VET-NET).

Lo scopo di questo progetto è di integrare le conoscenze disponibili all'interno del *network*, sulla biologia e sui meccanismi di patogenicità degli stipiti di VTEC e Salmonella e di sfruttare l'esperienza maturata dai diversi Istituti al fine di identificare un pannello di geni di virulenza e creare una piattaforma diagnostica in grado di identificare e discriminare tra i diversi cloni patogeni.

Nell'ambito del progetto verrà utilizzato l'approccio della genomica per determinare la presenza di geni di virulenza nei singoli cloni o patogruppi.

Lo stesso approccio sarà utilizzato per lo studio delle caratteristiche di virulenza degli stipiti di *Campylobacter spp.* e sarà lo scopo di progetti da presentare nel triennio in ambito nazionale e comunitario.

Risultati attesi nel triennio

Questa attività si propone di incrementare le informazioni sulla virulenza e sulla circolazione dei diversi cloni patogeni di questi batteri. In particolare permetterà di:

Comprendere il ruolo di putativi fattori di virulenza di Salmonella e VTEC.

Chiarire il profilo di espressione genica batterica in risposta a stimoli dall'ospite.

Identificare nuovi fattori di virulenza utilizzando metodi molecolari (*microarrays*) e fenotipici.

Creare strumenti per identificare specifici cloni patogeni di Salmonella e VTEC.

Nel triennio consentirà di:

Estendere il modello di caratterizzazione molecolare a stipiti di *Campylobacter spp.*

Studiare le caratteristiche di virulenza e la circolazione dei diversi cloni di *Campylobacter* patogeni per l'uomo.

Produrre uno schema di tipizzazione a livello molecolare dei ceppi di Salmonella, VTEC e *Campylobacter*, per individuare i cloni patogeni più diffusi.

Integrare le informazioni derivanti da questa attività con i dati epidemiologici prodotti nell'ambito di *network* nazionali ed europei per lo studio delle infezioni enteriche e delle zoonosi (EnterNet, MeVetNet).

Applicare i dati molecolari sulla presenza di determinanti di virulenza clone-specifici a studi di prevalenza in ospiti animali per identificare i serbatoi naturali dei diversi cloni patogeni e le vie di trasmissione all'uomo.

Sviluppare metodi molecolari quantitativi (*real Time PCR*) per l'identificazione di Salmonella, VTEC e *Campylobacter* per l'analisi del rischio.

Trasferibilità dei risultati

Disegno di una piattaforma diagnostica molecolare (*DNA arrays*) per l'identificazione da valutare attraverso *proficiency tests*;

Trasferimento delle metodiche per la sub-tipizzazione dei geni di virulenza degli stipiti isolati a una rete di laboratori periferici.

Confronto tra le caratteristiche dei ceppi isolati dall'uomo con quelle di ceppi isolati da animali e alimenti presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Messa a punto di studi sull'analisi del rischio microbiologico, limitatamente alle specie batteriche in esame, legato al consumo di alimenti di origine animale

**Dipartimento
Sanità Alimentare ed Animale**

Attività di valutazione, controllo, parere

Buona Pratica di Laboratorio; Ispezioni; OECD; Centri di Saggio

Le attività ispettive hanno comportato peraltro il raccordo con quelle svolte dagli Stati Membri della Unione Europea, nonché con i Paesi Membri della *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

Si prevede di continuare l'attività ispettiva presso i Centri di Saggio nazionali che già hanno avuto il riconoscimento di conformità per la necessaria verifica periodica, nonché presso i Centri di Saggio che aspirano ad ottenere tale riconoscimento. Sia nel contesto nazionale che comunitario e internazionale si attueranno tutte le possibili misure idonee a raggiungere lo scopo di una maggiore e più logica interazione tra il sistema di qualità basato sui principi di Buona Pratica di Laboratorio e quello concernente la norma ISO/IEC17025. Questa finalità verrà perseguita in modo specifico nell'ambito della *Organisation for Economic Co-operation and Development*, che a sua volta fornirà alla Unione Europea documenti dettagliati sulle modalità di raggiungimento di tale obiettivo che potranno fornire la base di Direttive a loro volta da adottare da parte degli Stati Membri. Sempre nel contesto della *Organisation for Economic Co-operation and Development*, si svilupperanno, in forma di Linee Guida, criteri armonizzati per la gestione e il riconoscimento reciproco delle attività di archiviazione dei documenti e dei materiali impiegati nella conduzione di studi di sicurezza non clinici. Infine, verrà avviato nel corso del triennio il nuovo programma della *Organisation for Economic Co-operation and Development* per le visite congiunte reciproche alle autorità di controllo per la Buona Pratica di Laboratorio nei singoli Paesi Membri. Ciò riguarderà, pertanto, anche l'Italia che sarà chiamata a partecipare attivamente a tali visite congiunte reciproche presso altri Paesi e a ricevere una di tali visite in data ancora da stabilire, ma comunque entro il prossimo triennio.

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, il reparto di Neurochimica del laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica 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. (*C24:0/C22:0 ratio in plasma sphingomyelin as a practical tool for the diagnosis of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy*. Di Biase et al Clin. Chem. Enzym. Comms. 7, 35.40, 1995). Dal 1995 vengono effettuati circa 100 dosaggi annuali di VLCFA su richiesta di ASL, Cliniche universitarie e IRCCS.

Piano triennale

Per il triennio 2006/2008 si intende proseguire l'attività di controllo del dosaggio plasmatico degli acidi grassi a lunga catena (VLCFA). Tale determinazione è utilizzata per la diagnosi biochimica della malattia genetica X-linka adrenoleucodistrofia (X-ALD), ed è richiesta da unità neurologiche e pediatriche sia universitarie che ospedaliere. Tale prestazione non tariffata è svolta nell'ottica di una collaborazione scientifica che si integra con il programma di ricerca: studio della interazione genotipo-ambiente nella patogenesi della adrenoleucodistrofia. La ricerca si propone di valutare il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patologia mediante modelli *in vitro*, e la casistica umana consentirà il trasferimento sull'uomo delle ipotesi e avvalorate dai risultati sperimentali.

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 sulla competenza dei laboratori di prova (ISO/IEC 17025) e clinici (ISO 15189). 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 stimolano il miglioramento delle operazioni di laboratorio; 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'Istituto Superiore di Sanità 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 16 analiti in tre diverse matrici, per ciascuno dei quali vengono distribuiti a ciascun richiedente 12 campioni l'anno, in quattro diverse occasioni. I risultati vengono raccolti, sottoposti a 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 oltre sei anni è in atto una collaborazione a livello internazionale con organizzatori di analoghi programmi a livello europeo e in Nordamerica per l'armonizzazione delle metodologie organizzative e di valutazione dei laboratori e la definizione di traguardi analitici condivisi.

Piano triennale

Nel corso dei prossimi tre anni, verranno attuate strategie volte a promuovere e ampliare il servizio offerto, al fine di:

raggiungere tutti i potenziali utenti sul territorio nazionale;

aumentare il repertorio di programmi di VEQ offerti
migliorare la qualità del servizio in particolare per quanto riguarda gli aspetti della riferibilità e dell'incertezza dei valori assegnati ai materiali di riferimento.

A questo fine, saranno attuate strategie di diffusione e pubblicizzazione del servizio offerto attraverso i canali istituzionali, i mezzi di comunicazione, siti Web e la registrazione in *database* dedicati (Eptis).

Sarà implementato un sistema di gestione per la qualità conforme a quanto richiesto dalle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e alle linee guida ISO Guide 34, ISO Guide 43-1 e ILAC G13. Il completamento dell'implementazione del sistema permetterà di richiedere l'accreditamento per le tarature di interesse prioritario.

Le informazioni di ritorno dagli utenti del servizio, raccolte mediante l'utilizzo di questionari di soddisfazione del cliente e l'analisi dei reclami, verranno utilizzate come strumento per l'analisi delle esigenze, la programmazione di studi di fattibilità per nuove coppie analita/matrice e il miglioramento del sistema di gestione per la qualità.

Per quanto riguarda gli aspetti della riferibilità e l'incertezza dei valori assegnati ai campioni distribuiti per la valutazione esterna di qualità, verranno implementati metodi di riferimento basati sulla spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente e diluizione isotopica.

Verranno proseguiti i programmi esistenti, con una frequenza di 4 esercizi per anno, ciascuno composto di tre materiali di controllo. Ai fini della valutazione complessiva dei risultati e dell'incertezza di misura dei singoli laboratori per ciascuna prova verranno gradualmente introdotti i metodi di calcolo riportati nella ISO/FDIS 13528.

Riconoscimento dei laboratori (ORL) e certificazione delle produzioni alimentari in relazione ad alcune problematiche emergenti

L'ISS quale Organismo responsabile del riconoscimento dei laboratori (ORL) preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, (DM 12/05/1999) e Laboratorio nazionale di riferimento per i residui (LNR) di anabolizzanti e farmaci veterinari negli animali e nelle produzioni alimentari (Dec. 98/356/CE, DL.vo. 336/99), è impegnato nella verifica, sorveglianza e armonizzazione delle attività dei laboratori ai fini della sicurezza alimentare e della tutela della salute umana. In tale contesto sono stati inoltre definiti i requisiti dei laboratori, i criteri di convalida dei metodi di analisi e organizzati circuiti interlaboratorio, quali strumenti indispensabili di verifica (Dec. 98/179/CE). A livello europeo, in adempimento a disposizioni europee in materia di competenza tecnica dei laboratori (ISO 17025) e di controllo dei residui (dir 96/23/CE), l'ISS è intervenuto per la soluzione di contenziosi internazionali e per il controllo della presenza di residui farmaco-tossicologici nei prodotti alimentari e per il corretto utilizzo dei farmaci veterinari. Il sistema qualità dell'ORL, l'innovazione delle risorse strumentali e le competenze del LNR consentono di intervenire per: - riconoscimento e sorveglianza dei laboratori ufficiali che effettuano il controllo degli alimenti; - riconoscimento dei laboratori privati incaricati dell'autocontrollo dei prodotti alimentari; - vigilanza dei laboratori di ricerca dei farmaci e degli anabolizzanti per il controllo anti-*doping* nell'uomo (DM 13/04/01); - controllo delle buone norme di fabbricazione e del corretto impiego di farmaci nell'ambito della farmacovigilanza veterinaria; - controllo dei residui di anabolizzanti e farmaci veterinari nei prodotti alimentari nell'ambito di contenziosi internazionali; - certificazione delle produzioni alimentari in relazione al rischio legato all'uso di sostanze farmacologicamente attive.

Piano triennale

Il Programma di attività intende continuare a garantire il rispetto delle disposizioni in materia di sicurezza alimentare attraverso la valorizzazione degli audit istituzionali ai laboratori che

effettuano il controllo ufficiale e l'autocontrollo degli alimenti. Per garantire la qualità dei dati, l'ORL si avvarrà di fornitori di servizio (circuiti di interconfronto, prove valutative) operanti in conformità alle indicazioni dell'ISO e dell'UE per la qualità.

Obiettivo prioritario sarà l'implementazione di un sistema di gestione della qualità conforme ai requisiti richiesti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17011. La piena operatività del sistema garantirà la possibilità di poter ricevere una verifica da pari ai fini di un accordo di mutuo riconoscimento fra organismi di riconoscimento a livello europeo. Allo scopo di razionalizzare gli interventi dell'ORL che riguardano in modo specifico le prove relative ai controlli alimentari, sarà favorita la collaborazione con l'ente nazionale di accreditamento dei laboratori che opera nel settore volontario per tutti i tipi di prove.

Sorveglianza e controllo delle infezioni da *Escherichia coli* O157 e altri *E.coli* enteroemorragici (EHEC)

Il Laboratorio di Medicina Veterinaria svolge da molti anni la funzione di laboratorio di riferimento per le infezioni da *E.coli* O157 e da altri EHEC, sia in campo umano che veterinario. L'attività riguarda compiti di riferimento diagnostico (conferma dei ceppi isolati dai laboratori periferici, controlli di qualità, tipizzazioni molecolari), la raccolta di dati epidemiologici, la partecipazione alle iniziative comunitarie di sorveglianza delle zoonosi come il progetto ENTER-NET. Essa è rivolta a strutture del Servizio Sanitario Nazionale quali i laboratori di microbiologia clinica, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, i PMP/ARPA. In particolare, su richiesta di strutture del SSN, il Laboratorio di Medicina Veterinaria: - conduce indagini diagnostiche su casi sporadici e epidemici di infezione da VTEC; - tipizza ceppi di *E.coli* isolati da casi clinici, alimenti e animali da allevamento; - fornisce stipiti di riferimento a laboratori del SSN; - ospita per brevi periodi di addestramento alle tecniche di laboratorio operatori di laboratori del SSN; - organizza iniziative didattiche quali corsi e *ring trial*, anche in collaborazione con altri enti o società scientifiche.

Piano triennale

Il Dipartimento continuerà a svolgere su questa tematica il ruolo di riferimento tecnico-scientifico per le strutture del Servizio Sanitario Nazionale. In particolare, provvederà a:

- Organizzazione e sviluppo di piani di monitoraggio in accordo con la Direttiva 2003/99/EC.
- Sviluppo e validazione di metodi di campionamento e analisi.

Sorveglianza e profilassi delle EST animali

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. Il Laboratorio esercita pure la funzione di riferimento a livello nazionale per lo studio del gene della PrP dei casi di scrapie ovi-caprina rilevati nell'ambito dell'attività di sorveglianza delle EST animali, nonché per la caratterizzazione dei ceppi di EST animali circolanti in Italia. Il Laboratorio svolge infine attività di consulenza in merito alle EST animali per il Ministero della Sanità e le strutture del SSN.

Piano triennale

Attraverso atti formali (Decreto 17 dicembre 2004; prot. DGVA.VIII/40081/P-I.8.d/28 del 22/12/2004, Prot. DGVA.VIII/22088/P-I.8.d/48 del 15/07/2004), il Ministero della Salute ha attribuito all'ISS specifiche funzioni di riferimento nazionale per la genetica e la caratterizzazione dei ceppi di EST: In particolare, il Dipartimento SAAN svolge le seguenti attività: 1) analisi del gene della proteina prionica (PrP) in tutti i casi di EST ovina confermati in Italia, nonché in un campione rappresentativo della popolazione degli ovini regolarmente

macellati; 2) caratterizzazione dei ceppi e discriminazione tra scrapie e BSE in tutti i casi di EST ovi-caprina confermati in Italia; 3) supporto tecnico-scientifico al Ministero della Salute e al SSN per l'attuazione del Piano di selezione nazionale degli ovini per la resistenza alle EST; 4) sviluppo e trasferimento di metodiche di analisi genetica ai laboratori che effettuano le analisi; 5) controanalisi genetiche su campioni oggetto di contenzioso; 6) armonizzazione di metodi di analisi impiegati dai laboratori riconosciuti e organizzazione di prove interlaboratorio; 7) addestramento tecnico a operatori del SSN; 8) attività ispettiva e di verifica nei laboratori che eseguono analisi genetiche su richiesta del Ministero della Salute; 9) assolvimento dei debiti informativi verso la Commissione Europea, il Ministero della Salute, il Centro di Referenza Nazionale, gli IZZSS e altri enti.

**Dipartimento
Tecnologie e Salute**

Attività di ricerca

Advanced cancer risk assessment methods

Si tratta di un “*Pilot Study*” internazionale supportato dalla NATO/CCMS (coordinamento Italia/USA), a cui collaborano esperti del Belgio, della Germania, della Grecia, della IARC, dell’Italia della Lituania, del Portogallo, della Repubblica Ceca, della Spagna, degli USA. Le tematiche del progetto includono procedure integrate per la stima del rischio cancerogeno a basse dosi (considerando nuovi risultati emergenti a livello cellulare, di tossico-cinetica e tossico-dinamica, e l’evoluzione temporale degli effetti in relazione a quella dell’esposizione) e valutando le conseguenze della suscettibilità individuale geneticamente ereditata o acquisita sul rischio individuale. A tal fine è anche studiata la variabilità di parametri biologici di rilievo e sono proposti criteri statistici finalizzati a individuare condizioni di suscettibilità. Sono anche esaminati risultati emergenti da studi sulla tossicità riproduttiva, proposti criteri per l’ottimizzazione di studi epidemiologici ai fini delle stime di rischio, e presentati *case-studies*.

Risultati attesi nel triennio

Proposta di metodi avanzati per la valutazione del rischio cancerogeno.

Trasferibilità dei risultati

Aggiornamento di metodi per la valutazione del rischio.

“Risk assessment of Chernobyl accident consequences: lessons learned for the future”: sviluppi

A seguito di un *workshop* tenutosi a Kiev sulla tematica, la NATO/CCMS ha approvato, con un supporto economico, il progetto in questione nel 2002, coordinato dall’Italia dagli USA e dall’Ucraina, a cui collaborano ricercatori di istituti dell’Ucraina, della Bielorussia, della Russia, della Moldavia, degli USA (NIH, CDC; US EPA), della Germania, della Grecia, del Portogallo. Dal 2002 al 2005 si sono avute riunioni e lavori congiunti del gruppo di ricerca a Kiev e a Roma. L’oggetto dello studio è la revisione e valutazione dei dati più recenti ai fini di aggiornamento delle stime di rischio per la salute e delle definizioni di strategie di prevenzione in condizioni analoghe. I risultati di maggior rilievo discussi nel 2005 riguardano un incremento dei tumori della mammella in donne maggiormente esposte, della leucemia nei lavoratori che in particolare nei primi due anni a seguito dell’incidente hanno operato per attività di emergenza e di bonifica, un incremento di patologie cardiovascolari e cerebrovascolari, di patologie neurologiche e di effetti psicologici, e aspetti demografici di rilievo (ad esempio, riduzione della natalità dopo l’incidente per scelte conseguenti alle condizioni critiche sociali e ambientali effettive e/o percepite). Recentemente è stata anche riesaminata la storia della risposta di emergenza a seguito dell’incidente, identificando gli aspetti positivi e negativi, con il fine di proporre strategie per la pianificazione delle emergenze.

Risultati attesi nel triennio

Predisposizione di uno studio aggiornato sulle tipologie di rischio e sulle condizioni di esposizione a cui sono associate, sulla base delle conoscenze acquisite a circa 20 anni dall’incidente, in un periodo temporale in cui anche patologie emergenti a lunga latenza dall’esposizione possono essere rilevate. Contributo alla definizione di strategie per la pianificazione della risposta a emergenze similari e per la prevenzione dei rischi a breve e lungo termine. Predisposizione di una monografia con diffusione internazionale.

Trasferibilità dei risultati

Lezioni apprese dall’esperienza maturata da esperti e tecnici direttamente coinvolti nella gestione dell’incidente di Chernobyl. Condizioni di rischio maggiormente critiche. Criteri di

prevenzione delle conseguenze. Proposta di strategie per la risposta ad emergenze simili, inclusi eventi di sabotaggio.

Analisi *in-vitro* di nanocompositi per odontoiatria conservatrice e protesica

La nuova rivoluzione nei materiali non metallici, progettati e realizzati con lo scopo di essere utilizzati e impiantati nel corpo umano, è rappresentata dall'introduzione dei nanocompositi. Questo tipo di materiali sembra avere delle prestazioni nettamente superiori ai precedenti compositi macroriempiti, microriempiti e ibridi. La loro provenienza dai caschi degli astronauti americani, sembra dare già rassicuranti garanzie per quanto riguarda le loro prestazioni di resistenza a *stress* meccanici e ambientali. Le qualità necessarie di biocompatibilità derivano dalle ormai accertate proprietà dei compositi, ormai da anni assicurate dal loro esteso utilizzo *in vivo*.

Le qualità che si richiedono a questi materiali, definiti nanocompositi, non sono dovuti soltanto alla loro composizione, ma anche alla loro struttura e ad alcuni particolari legami chimici, che gli permettono di soddisfare particolari richieste funzionali.

Nell'ambito di quest'attività di ricerca si vuole studiare l'applicazione di tali materiali nelle riparazioni tissutali che si applicano in conservativa valutando le loro *compliance* statiche e dinamiche in accoppiamento con i tessuti dentali coinvolti. Inoltre si vuole valutare l'influenza di tali materiali sui tessuti dentali nelle applicazioni in odontoiatria protesica, in modo tale che il loro comportamento nel cavo orale sia il più simile a quello naturale

Risultati attesi nel triennio

Lo scopo principale di questa attività di ricerca sarà quello di valutare *in vitro* numerosi campioni di elementi dentali simulando danni tissutali provocati da diverse patologie e riparati con nanocompositi. I campioni saranno sottoposti a *stress* di tipo statico e dinamico, a seconda del protocollo di prova definito in precedenza, per la simulazione della rottura che si vuole ottenere. Tramite numerosi cicli di *stress* termici e di fatica si valuterà anche l'efficacia dell'interfaccia tessuto-nanocomposito che si viene a creare in seguito alle riparazioni conservative. L'adesione tra i tessuti e i nuovi materiali compositi, che è una delle caratteristiche più importanti da migliorare nel cavo orale, verrà valutata tramite l'applicazione di sforzo di taglio.

Inoltre verranno realizzati interamente elementi dentali con i nuovi materiali per valutare tramite metodiche tradizionali e nuove, quali la microtomografica tridimensionale, il fenomeno dell'usura provocata dal ciclo masticatorio, simulato *in-vitro* tramite prove a fatica. Sarà accuratamente valutata anche l'usura subita dagli elementi dentali naturali in opposizione tra loro e in opposizione a quelli realizzati con i nanocompositi. Tramite la microtomografica e le sofisticate tecniche di ricostruzione 3D a disposizione, è possibile visualizzare qualitativamente e valutare quantitativamente le zone che sono state usurate durante le prove meccaniche a fatica

Trasferibilità dei risultati

Questa attività di ricerca vuole dare un contributo alla valutazione di questi nuovi materiali utilizzati nei settori dell'odontoiatria protesica e conservativa. Con questa ricerca però, non si vogliono solo valutare le prestazioni meccaniche di tali materiali ma anche l'efficacia del loro utilizzo e quindi dell'accoppiamento con altri materiali e con i tessuti dentali, quali smalto e dentina.

I risultati potranno contribuire all'utilizzo più mirato di questi materiali, e al maggior rispetto e conservazione dei tessuti con cui sono accoppiati o con cui possono venire a contatto ripetutamente

Applicazioni della Risonanza Magnetica Nucleare in radiobiologia

Gli studi sono rivolti all'identificazione delle applicazioni della spettroscopia di Risonanza Magnetica nucleare (MRS) su sistemi cellulari di diversa origine e complessità, in seguito all'esposizione delle cellule a diversi tipi di radiazione. Le modificazioni del *pattern* spettrale riflettono le modificazioni metaboliche indotte dalle radiazioni. Queste a loro volta possono essere correlate con gli effetti biologici, in particolare con gli effetti sul ciclo e con la morte cellulare. I segnali identificati come metaboliti di interesse e le loro caratteristiche in termini di intensità possono essere considerati "marker spettroscopici".

In questi studi viene utilizzata la MRS in alta e altissima risoluzione, avvalendosi della strumentazione presente in Istituto (400 MHz) e disponibile presso l'Università di Tor Vergata (700 MHz), entrambe facenti parte del parco strumentale a disposizione dell'ISS.

Le attività sperimentali sono finalizzate a mettere in evidenza sia gli effetti diretti che gli effetti mediati dal metabolismo, in seguito all'esposizione diretta delle cellule a radiazione gamma e a fasci di protoni, a causa del crescente uso terapeutico di questi ultimi. Vengono quindi effettuati studi comparativi. Vengono inoltre studiati gli effetti, noti come *bystander*, relativi al trasferimento di danno da cellule irraggiate a cellule non irraggiate.

I sistemi prescelti sono cellule tumorali di origine umana in coltura esaminate in toto o mediante l'osservazione dei metaboliti negli estratti acquosi e lipidici. Vi è particolare attenzione ai composti e ai metaboliti che danno luogo a segnali che sono visibili anche *in vivo*, in quanto le osservazioni condotte sulle cellule possono preludere ad applicazioni *in vivo* in relazione agli sviluppi delle nuove terapie antitumorali con radiazioni.

Risultati attesi nel triennio

Le osservazioni spettroscopiche verranno correlate alla morte cellulare indotta dal trattamento con radiazioni, con particolare attenzione alla presenza di apoptosi, e alle variazioni del ciclo cellulare, avvalendosi anche della collaborazione con altri gruppi presenti in ISS. Gli aspetti metabolici attualmente allo studio sono relativi al metabolismo lipidico (i segnali degli acidi grassi presenti nei trigliceridi intracellulari, il rapporto saturazione/insaturazione e i metaboliti legati al ciclo della colina); le specie attive nella detossificazione cellulare, quali ad esempio il glutatione, che interviene nei meccanismi di protezione dei danni ossidativi.

In termini operativi ci si propone di

verificare la correlazione fra le modificazioni dei segnali MRS derivati dai lipidi neutri e le modificazioni del ciclo cellulare, in relazione alle modificazioni della sintesi lipidica

esaminare i segnali del GSH in relazione alla morte apoptotica, anche in seguito a trattamenti esterni per ridurre o aumentare la concentrazione di questa molecola. Ciò allo scopo di chiarire alcuni aspetti del signalling intracellulare correlato all'apoptosi.

confrontare gli effetti dell'irraggiamento gamma e dell'irraggiamento con protoni, anche in relazione alle differenze di efficacia biologica relativa

esaminare i possibili meccanismi di trasferimento del danno dalle cellule irraggiate a cellule non irraggiate, mediante osservazioni sui terreni di coltura e sulle cellule stesse

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a congresso

Applicazioni di calcolo parallelo nel settore dei biomateriali e dei biosistemi

Il calcolo numerico in campo biomedico rientra tra le competenze che da lunga tradizione afferiscono ai laboratori dell'ISS che sono confluiti nel Dipartimento di Tecnologie e Salute.

Con la presente attività si intende dare continuità a tale tradizione attraverso lo sviluppo di applicazioni di calcolo parallelo facendo ricorso al *cluster* di pc di recente messo in funzione

presso il reparto di Biomateriali e Biosistemi e che ha anche riscosso l'interesse di altri reparti del dipartimento e di altre strutture dell'ISS.

Per *cluster* di calcolo si intende un insieme di nodi di calcolo collegati tra loro, attraverso una rete (attualmente a 1Gb) e un insieme di *switches*, alla stazione di calcolo principale denominata "*master*". Il *master* è a sua volta connesso alla rete ISS e, attraverso essa, alle stazioni degli utenti. Ciascun nodo di calcolo è costituito da un PC *diskless* (cioè privo di risorse di memoria di massa e che si avvia attraverso la rete del *cluster* stesso).

L'architettura proposta è quella attualmente dominante nei sistemi ad alte prestazioni anche in campo biomedico; sistemi di questo tipo hanno dato un contributo decisivo nel progetto genoma umano e si attendono grossi contributi in generale nella bioinformatica, nella proteomica e anche in settori tradizionali della bioingegneria quali la biomeccanica e la fluidodinamica fisiologica. A questi occorre aggiungere applicazioni biofisiche e dosimetriche: tutti settori nei quali si intende utilizzare il *cluster*.

Risultati attesi nel triennio

Sul *cluster* verranno implementati modelli matematici inerenti a temi di ricerca già avviati in passato e, quindi la simulazione numerica sarà sempre affiancata ad attività di misura e, in generale, sperimentale. Tra queste ci si occuperà della caratterizzazione biomeccanica di tessuto osseo ricostruito su biomateriali di supporto utilizzati in combinazione con cellule staminali; i modelli strutturali verranno confrontati con i dati sperimentali ottenuti da misure sistematiche con microdurimetria Knoop. Verrà proseguito lo studio sperimentale e computazionale dei meccanismi di formazione di membrane modello, loro stabilità e possibile utilizzo come rivestimento di dispositivi impiantabili, carrier di farmaci, biosensori e applicazioni nanotecnologiche mediante tecniche di Langmuir, microscopia ad angolo di Brewster e microscopia a forza atomica; si integrerà tale indagine con simulazioni di dinamica molecolare con particolare riguardo ai meccanismi di formazione e coalescenza di liposomi. Si completerà l'attività relativa al *data mining* con lo scopo di elaborare indici e modelli di valutazione degli esiti dell'impianto di protesi articolari d'anca. Si svilupperanno, infine, modelli relativi a strategie di controllo nell'esecuzione di semplici *task* motorii.

Trasferibilità dei risultati

L'utilizzo del *cluster* consentirà di correlare i diversi risultati sperimentali con l'intento, tra gli altri, di migliorare la comprensione dei meccanismi di riassorbimento e riadattamento del tessuto osseo con la prospettiva di ottimizzare un protocollo di valutazione degli *scaffold* e del tessuto ricostruito in vista di un utilizzo clinico di tali metodiche di ingegneria tissutale. Dallo studio sugli aspetti computazionali delle biomembrane si potranno chiarire alcuni meccanismi di base nell'eventualità di un utilizzo dei liposomi come carrier di farmaci e come elemento strutturale di sistemi di biosensori. Ricadute sono attese per la messa a punto di protocolli di valutazione di dispositivi medici e, in generale, nel porre le basi di quelle competenze di calcolo parallelo di cui sopra si è accennata l'importanza.

Attività della lattoferrina e della lattoferricina in cellule trasformate da virus a DNA

In questi ultimi anni molta attenzione è stata rivolta alla ricerca di nuovi farmaci naturali ad attività antitumorale e antimicrobica. Studi su modelli animali hanno dimostrato che la lattoferrina, una delle maggiori componenti proteiche del latte, è in grado di prevenire la carcinogenesi del polmone, dell'esofago e del colon nel ratto e la formazione di metastasi in topi con carcinoma del colon, suggerendone la potenziale applicazione per la profilassi e la terapia di varie forme di carcinoma. Poiché in molti studi condotti *in vivo* sull'attività antitumorale della lattoferrina questa si è dimostrata attiva quando somministrata per via orale, è stato suggerito che tale attività possa essere ascritta ai frammenti derivati dalla sua digestione a livello

gastrointestinale e, in particolare, alla lattoferricina, un peptide dotato di una potente azione antimicrobica. È stato riportato che il trattamento con lattoferricina induce l'apoptosi in numerose linee cellulari umane derivate da carcinomi e leucemie.

Nel campo della patologia infettiva ricerche mirate all'individuazione di nuovi farmaci antivirali hanno dimostrato che l'attività protettiva del latte umano, per lungo tempo attribuita esclusivamente alla presenza di IgA secretorie, può essere mediata anche da altri componenti di natura proteica, quali la lattoferrina. Infine, i risultati di un trial clinico preliminare in pazienti con epatite cronica attiva hanno dimostrato che la lattoferrina inibisce l'infezione da virus dell'epatite C, considerata un fattore importante nello sviluppo del carcinoma epatocellulare.

Sulla base di queste osservazioni appare di estremo interesse approfondire lo studio dell'attività antitumorale e antivirale della lattoferrina analizzando il suo effetto sulla trasformazione neoplastica indotta da virus in sistemi *in vitro*.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di studiare e caratterizzare l'attività antineoplastica della lattoferrina umana e bovina e l'attività proapoptotica della lattoferricina bovina, a concentrazioni fisiologiche e eventualmente in associazione con altri farmaci, allo scopo di stabilire se siano in grado di inibire o controllare il processo di trasformazione neoplastica indotto da virus e possano quindi essere utilizzate per la messa a punto di interventi terapeutici mirati. A questo scopo l'attività antitumorale della lattoferrina sarà analizzata in cellule trasformate da virus a DNA quali virus BK, *papillomavirus* e *herpesvirus* attraverso studi biochimici, ultrastrutturali e immunocitochimici.

Lo studio proseguirà valutando l'azione inibente di diverse frazioni di lattoferrina nei confronti della trasformazione virale al fine di identificare le strutture, le componenti e, possibilmente, le sequenze aminoacidiche responsabili dell'attività antitumorale della molecola.

Essendo noto che molti agenti chemioterapici agiscono inducendo apoptosi nelle cellule neoplastiche e che peptidi derivati dalla lattoferrina inducono apoptosi in cellule leucemiche, saranno valutate l'attività inibente la proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi in cellule trasformate da virus e debitamente trattate con lattoferricina a vari tempi e concentrazioni, tramite microscopia ottica ed elettronica, tecniche di biologia molecolare e tecniche immunocitochimiche.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione dell'attività della lattoferrina in cellule trasformate da virus sarà utile per lo sviluppo di nuove terapie per la lotta ai tumori di origine virale.

L'identificazione delle componenti della lattoferrina dotate di attività antitumorale aggiungerà informazioni essenziali per la caratterizzazione delle proprietà chemioterapiche di questa molecola. L'identificazione dei meccanismi responsabili dell'attività antiproliferativa, proapoptotica e antivirale della lattoferricina fornirà elementi utili a confermare l'ipotesi che molte delle attività della lattoferrina sono mediate da questo peptide.

Basi biofisiche e radiobiologiche della radioprotezione

L'attività riguarda lo studio di alcuni aspetti critici nella catena di eventi che portano, dal deposito iniziale dell'energia della radiazione, all'induzione e al *processing* del danno sul DNA, sino alle modifiche nella funzionalità cellulare.

L'induzione e la riparazione del danno (soprattutto doppie rotture, DSB) nel DNA cellulare sarà studiata combinando metodologie sperimentali avanzate (quali l'elettroforesi pulsata calibrata e l'analisi della fosforilazione dell'istone H2AX) con modelli teorici sviluppati per valutare la distribuzione spaziale delle DSB.

Queste informazioni saranno associate a quelle sulle modificazioni cromosomiche (induzione di micronuclei) e cellulari (morte riproduttiva, induzione di mutazioni). Saranno valutati, oltre agli usuali effetti *targeted*, anche i cosiddetti effetti *non targeted* (cioè in cellule non colpite dalla radiazione), che appaiono importanti nella risposta cellulare alle basse dosi.

Si utilizzeranno sistemi biologici costituiti da cellule di origine umana coltivate *in vitro*, incluse quelle inducibili a differenziamento. Saranno confrontati gli effetti indotti da diversi tipi di radiazione, quali raggi gamma, particelle alfa e altre particelle cariche.

Il ruolo della comunicazione cellulare e dell'interazione cellula-cellula sarà valutato utilizzando co-culture di cellule in monostrato e/o sferoidi.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione della frammentazione del DNA, con particolare riguardo al ruolo giocato dalla qualità della radiazione e/o dal differenziamento cellulare.

Informazioni sulla riparabilità delle DSB in funzione qualità della radiazione.

Informazioni sul ruolo dell'interazione cellula-cellula nella risposta a radiazioni ionizzanti.

Caratterizzazione dei meccanismi dell'”effetto *bystander*” (che si manifesta con danni in cellule non direttamente colpite dalla radiazione e in conseguenza di segnali molecolari emessi dalle cellule colpite vicine) mediato dal terreno di coltura.

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.

Biofilm microbici: formazione, inibizione e disaggregazione

1. Studio delle modalità di formazione di *biofilm* batterici e funghi sulla superficie di dispositivi medici impiantabili.

Le indagini riguarderanno la produzione di *biofilm* da parte di specie batteriche sia gram-positive (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*) che gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), nonché di specie fungine (*Candida albicans*), su cateteri venosi centrali (CVC) e *stent* biliari (SB).

2. Sviluppo di sistemi-modello polimero-antibiotico capaci di inibire la colonizzazione microbica e la produzione di *biofilm*.

Tali sistemi prevedono l'adsorbimento e/o l'incorporazione, nelle matrici polimeriche costituenti i dispositivi medici impiantabili, di sostanze antimicrobiche o antisettiche che, rilasciate a dosi opportune, agiscano direttamente sul possibile sito di infezione.

3. Sviluppo di prototipi di CVC antimicrobici.

4. 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.

5. Crescita sessile, formazione di *biofilm*, antibiotico-resistenza e virulenza di specie batteriche ambientali e ad habitat intestinale.

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 Dip. di Chimica dell'Università La 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-former*;
 - e antifungini
3. Sviluppo, in collaborazione con un'industria nazionale, di prototipi di CVC anti-*biofilm* realizzati con poliuretani funzionalizzati per l'adsorbimento/intrappolamento di uno o più antibiotici e per il loro rilascio controllato.
4. 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 recentemente sottoscritto dal Presidente dell'Istituto uno specifico "*Research Materials Transfer Agreement*".
5. Valutazione della sicurezza di impiego come probiotici di ceppi di enterocchi in funzione della loro capacità di formare biofilm al cui interno, com'è noto, gli scambi di materiale genetico e in particolare di determinanti di antibiotico-resistenza sono particolarmente favoriti.
Caratterizzazione delle modalità di adesione a substrati e formazione di *biofilm* in *Vibrio cholerae* e *Aeromonas hydrophila*.

Trasferibilità dei risultati

1. Implementazione dei controlli di qualità dei CVC.
- 2-3. Sviluppo di innovativi CVC anti-*biofilm*.
4. Individuazione di alternative cliniche alla rimozione dei CVC in caso di infezioni associate.
5. Contributi alla sicurezza di impiego di prodotti ittici per l'alimentazione e di prodotti probiotici per uso umano.

Caratterizzazione chimico-fisica ed effetti biologici del particolato urbano aerodisperso

Molti meccanismi sono stati proposti per spiegare l'effetto del particolato sulla salute delle popolazioni esposte, è tuttavia ancora ampiamente dibattuta la questione di quali siano i fattori determinanti per tale effetto. Ad oggi vi è comunque un largo accordo sull'ipotesi che tra i fattori implicati vi siano la composizione chimica delle particelle del PM10 e la loro capacità di veicolare sostanze potenzialmente tossiche (come sostanze organiche e metalli pesanti) adsorbite sulla superficie.

È stato dimostrato inoltre che le frazioni granulometriche maggiori (diametro aerodinamico compreso fra 2.5 e 10 μm) siano quelle in grado di indurre la risposta infiammatoria più importante, forse per la più abbondante presenza di endotossina batterica, un lipopolisaccaride (LPS) che appare giocare un ruolo chiave nello sviluppo di allergie e asma infantile in ambiente metropolitano.

Sono individuati i seguenti temi di indagine:

Caratterizzazione chimico-fisica delle principali componenti presenti nelle frazioni granulometriche del PM10 mediante tecniche di microscopia elettronica a scansione e microanalisi X con spettroscopia a dispersione di energia

Valutazione delle abbondanze di radicali di interesse tossicologico (SO₄²⁻, NH₄⁺) e di gruppi funzionali a cui è legato il carbonio (C-C/C-H, C-O/C-N, C=O, COOH) nelle componenti fine e ultrafini del particolato mediante spettroscopia XPS (spettroscopia di foto elettroni).

Valutazione dei livelli di endotossina nelle frazioni *fine* e *coarse* del PM10 e studio dell'influenza dei fattori climatici sulla concentrazione dell'endotossina associata al particolato.

Studi di citotossicità e risposta infiammatoria *in vitro*.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione e valutazione del "peso" relativo delle sorgenti di particolato in un ambiente urbano.

Individuazione del ruolo dei fattori climatici sulle caratteristiche chimico-fisiche delle particelle presenti in un'atmosfera urbana

Individuazione del ruolo dei fattori climatici sulle caratteristiche chimico-fisiche delle particelle presenti in un'atmosfera urbana.

Individuazione dei fattori determinanti la presenza di LPS nell'atmosfera urbana

Correlazione dei dati relativi alla caratterizzazione chimico fisica delle frazioni granulometriche del particolato aerodisperso con la tossicità e il rilascio di mediatori dell'infiammazione

Trasferibilità dei risultati

Fornire dati alle amministrazioni locali e alle unità operative del Servizio Sanitario per giungere alla definizione di una azione reale di controllo delle emissioni e della concentrazione di polveri in un'area urbana sulla base delle valutazioni del progetto

Caratterizzazione *in vitro* di dispositivi protesici per il sistema cardiovascolare

L'attività di ricerca ha i seguenti obiettivi generali: sviluppare e applicare tecniche e metodiche per la valutazione funzionale e tecnologica dei dispositivi medici impiantabili nel settore cardiovascolare in diverse condizioni (patologiche e non); individuare e valutare i rischi connessi con l'uso di tali dispositivi e pianificare aggiornamenti dell'analisi dei rischi come richiesto dalle normative riguardanti i dispositivi medici.

Per quanto riguarda le valvole cardiache protesiche e le pompe cardiache di supporto ci si propone di continuare la caratterizzazione del rischio fluido-meccanico (complicanze tromboemboliche e emolitiche) mediante lo studio *in vitro* su simulatori di circolo e assistenze ventricolari, utilizzando tecniche cinematografiche e anemometriche allo stato dell'arte (3D PIV). Verranno confrontati i risultati con quelli relativi a tecniche di ampio uso clinico (eco *doppler*) e verrà studiata la possibilità di sviluppare l'applicazione della tecnica NMR angiografica allo studio della turbolenza.

Nel caso delle protesi vascolari e degli *stent* la ricerca si propone invece di continuare le indagini volte a chiarire il ruolo dei fattori fluido-meccanici correlati con le principali patologie (ipertensione, arteriosclerosi, stenosi, alterata distensibilità parietale) e complicanze *post-impianto* (proliferazione miointimale, arteriosclerosi, restenosi).

Risultati attesi nel triennio

Ricognizione di indagini cliniche e delle acquisizioni più recenti in ambito nazionale e internazionale, nel caso di alcune patologie specifiche, che coinvolgono l'uso dei dispositivi protesici oggetto della ricerca con particolare riguardo al riconoscimento ecografico della corretta funzione valvolare protesica (*Effective Orifice Area*), alla valutazione della impedenza

vascolare e della contrattilità ventricolare in casi patologici e non al fine di fornire un supporto bioingegneristico allo studio del fallimento degli impianti protesici a partire dai dati anatomo-patologici degli espunti disponibili in Italia e all'estero. In particolare saranno applicate le metodiche anemometriche, già messe a punto, al fine di realizzare atlas dei campi fluidodinamici base per le valutazioni ecografiche cliniche.

Saranno inoltre sviluppati nuovi protocolli di valutazione con particolare riguardo alla simulazione *in vitro* di circuiti di assistenza meccanica al circolo.

Trasferibilità dei risultati

Attività di divulgazione relativamente agli aspetti teorici e alle applicazioni 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

Certificazione Europea di elettro-cateteri per *pacemaker*

Dal 1994 quest'Istituto, essendo stato designato in ambito europeo Organismo Notificato n.0373, rilascia certificazione europea di dispositivi medici impiantabili attivi, quali *pacemakers* e elettrocateri, in base all'allegato 3 della direttiva 90/385/CEE.

In base all'allegato 3 devono effettuarsi sui prodotti, a cui dare il permesso per l'immissione in commercio, delle prove di tipo tecnologico-funzionale.

Inizialmente su tali prodotti venivano applicate le normative tecniche correnti nei paesi membri insieme con quelle normative europee tecniche appena uscite, quali la EN 50077, che riguardava la standardizzazione delle parti di connessione di questi dispositivi, uniformandoli tutti alla configurazione IS-1 UNI.

Per una uniformità di valutazione tra gli stati membri europei, recentemente sono state emesse normative tecniche europee su questi dispositivi impiantabili, quali la EN 45502-2, la EN 45502-2-1 e la EN 45502-2-2.

Secondo tali normative vengono indicate tutte le prescrizioni, dal confezionamento alle *compliance* funzionali, che un dispositivo deve soddisfare per essere immesso in commercio in Europa.

Alla luce di questa evoluzione normativa devono mettersi a punto, nei nostri laboratori di prova di tali dispositivi impiantabili, le procedure, le prove tecniche con la relativa strumentazione per eseguirle. Per questo, sicuramente, serviranno delle risorse per realizzare la completa attuazione di tali normative tecniche.

Nel laboratorio prove elettrocateri sin dall'inizio dell'anno 2005, con le risorse a disposizione, si applica parzialmente la normativa verticale EN 45502-2-2.

Il tempo per la verifica totale di un dispositivo impiantabile attivo quale l'elettrocatero per *pacemakers*, prevede un periodo di tempo che si aggira intorno ai 30 giorni, in quanto ci sono delle prove, come la termostatazione a 37°C oppure le prove di fatica su numerose parti del corpo, che impiegano circa 10 gg per la loro effettuazione.

Risultati attesi nel triennio

Dal 1994 ad oggi, la certificazione di tipo degli elettrocateri per *pacemakers* ha controllato ed emesso certificato per circa 150 di prodotti, con richieste provenienti da 4 industrie costruttrici presenti sul territorio nazionale.

Dal 1994 si sono effettuati anche rinnovi di certificazione per certe famiglie di prodotti.

Mediamente per anno, per questo tipo di attività, sono stati incassati circa 20 000 euro.

Le previsioni per il futuro rimangono stabili; sono previsti diversi rinnovi di certificazione insieme richieste per l'immissione in commercio di nuovi prodotti.

Il mercato sta richiedendo elettrocatereteri con la parte distale ricoperta di farmaco, per cui noi ISS, siamo costretti a richiedere il parere dell'autorità competente (Agenzia del farmaco) con una notevole espansione dei tempi dell'*iter* di certificazione. Ci aspettiamo per il futuro un più valido ed energico supporto di tale attività, che anche se in grado di quasi autofinanziarsi, molte volte si trova totalmente senza possibilità di risorse di qualsiasi genere.

Trasferibilità dei risultati

Nel nostro laboratorio prove elettrocatereteri, da anni si lavora per effettuare le prove di certificazione di tipo per l'immissione in commercio degli elettrocatereteri per *pacemakers*, nel modo migliore possibile.

Tale attività di controllo e di prove tecnologico-funzionali, può rappresentare una sicurezza per l'utilizzo di tali dispositivi.

Con l'attività di ispezione e di sorveglianza, presso le ditte produttrici di tali dispositivi impiantabili, si contribuisce a che la normativa comunitaria venga rispettata e attuata in modo affidabile nel processo produttivo, e che i rischi per i pazienti vengano minimizzati.

Codici Monte Carlo e modelli di calcolo per applicazioni in fisica medica e ambientale

Obiettivo di questa attività di ricerca è poter fornire strumenti di previsione e valutazione relativamente all'uso delle radiazioni in medicina (terapia e diagnostica) e alla presenza di radiazioni nell'ambiente. Utilizzando e potenziando le risorse di calcolo disponibili nel gruppo di lavoro coordinato dalla proponente, si vuole condurre uno studio comparativo con i diversi codici Monte Carlo disponibili in ambito scientifico (Geant, Fluka, BEAM) nella modellizzazione di acceleratori usati in radioterapia. Analogamente si vuole condurre uno studio di simulazione con codice Monte Carlo per tecniche diagnostiche di nuova generazione.

L'utilizzo di codici Monte Carlo e modelli di calcolo verrà poi estesa anche a problemi di tipo ambientale, anche in relazione a problemi di tipo radioprotezionistico in missioni spaziali.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio ci si propone di raggiungere i seguenti obiettivi:

Disponibilità verso la comunità scientifica di dati che consentano di valutare l'accuratezza di calcolo dei codici Monte Carlo utilizzati in relazione a uno specifico caso studiato.

Modellizzazione di sistemi CT-PET per il loro uso ottimale anche in relazione alla radioprotezione del paziente.

Utilizzo di codice Monte Carlo (GEANT4) e specifici modelli di calcolo per la descrizione dell'ambiente di radiazione su Marte (potenzialmente supportato da un progetto ESA)

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a convegni, codice di calcolo

Controllo dell'avvio e dell'inibizione del movimento: analisi elettrofisiologica e teorica del correlato neuronale a livello di popolazione

In collaborazione con il Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università di Roma "La Sapienza", e con la consulenza del *Sensorimotor Research National Eye Institute* (NIH).

La questione centrale è se l'avvio o l'inibizione del movimento si basino su un sistema di controllo unico o diversificato per diversi effettori (occhio o mano, ad esempio), e i principi di elaborazione sottesi. Una forma estrema di controllo del movimento è costituita dalla sua completa soppressione. Nel "paradigma del *countermanding*", si richiede al soggetto di effettuare un movimento alla comparsa di un segnale di go, ma di abortire il movimento se, in un certo

intervallo dopo il *go*, compare un segnale di *stop*. Il correlato neuronale nel caso di un movimento effettuato con la mano è attualmente ignoto. Il progetto affronta questo problema mediante protocolli che richiedono integrazione visuo-motoria, registrando simultaneamente da diverse posizioni appartenenti ad aree motorie e premotorie del cervello del macaco.

A livello teorico, il progetto procede su due linee: a) stima dell'attività di popolazioni neuronali dall'attività registrata di singola unità, "*local field potential*" e *multi-unit activity*, e studio delle proprietà spettrali dipendenti dal tempo di queste quantità, in relazione alle diverse fasi del protocollo sperimentale; b) studio delle modificazioni delle proprietà spettrali dell'attività di popolazione in relazione con l'apprendimento di varianti del compito di *countermanding*.

Risultati attesi nel triennio

Chiarire il modo in cui le aree registrate cooperano per il controllo oculo-motorio nel compito di *countermanding*, e specificamente per l'avvio e l'inibizione del movimento. Registrare simultaneamente i segnali di singola unità, di *local field potential* e di *multi-unit activity* e stabilire un legame semi-quantitativo con le predizioni teoriche dei modelli sviluppati. Caratterizzare l'apprendimento a breve termine necessario all'animale per adattarsi a varianti introdotte nel compito da svolgere; studiare la corrispondente evoluzione delle caratteristiche spettrali delle attività delle popolazioni neuronali coinvolte, utilizzando impianti cronici. Sviluppare algoritmi per la decodifica dell'intenzione motoria a partire dal dato elettrofisiologica, utilizzando la teoria per caratterizzare le relazione input-output della rete neuronale distribuita coinvolta. La capacità di tali algoritmi di predire il comportamento motorio è rilevante per lo sviluppo di interfacce (*Brain-computer Interface*) che traducono l'attività nervosa registrata in istruzioni eseguibili da una protesi artificiale.

Trasferibilità dei risultati

Gli algoritmi sviluppati per la decodifica dell'intenzione motoria sono rilevanti per lo sviluppo di dispositivi di *Brain-Computer Interface*

Correlazioni fra caratteristiche chimico-fisiche ed effetti biologici di nanoparticelle

Le nanotecnologie sono l'ultima frontiera tecnologica. La loro potenzialità costituirà la chiave di accesso a molte applicazioni, come dimostrato dai forti investimenti in USA, Giappone e EC.

In medicina una delle applicazioni più dirette e promettenti delle nanotecnologie è l'uso mirato di nanoparticelle (NP) per applicazioni biomedicali nel campo del riconoscimento, *drug delivery* e *imaging*. Il rapido sviluppo delle nanotecnologie tuttavia determinerà verosimilmente un importante incremento delle modalità di esposizione, professionale e/o ambientale, a NP per inalazione, ingestione e contatto con l'epidermide. La ricerca scientifica in campo internazionale e nazionale sta focalizzando l'interesse sullo studio delle NP come agenti estranei potenzialmente dannosi per l'organismo. Recentemente, nell'ambito di vari studi scientifici è stato segnalato che le barriere fisiologiche (mucose polmonari e gastrointestinali) sono inefficaci ad escludere le NP dall'entrare negli organismi viventi. La presenza di nano-entità (ad es. nanopolveri) estranee negli organi interni come il fegato, i linfonodi o le gonadi di individui malati esposti, ha spinto i ricercatori ad allertare gli operatori coinvolti nella produzione di NP della necessità di redigere nuove procedure di sicurezza per la salute umana. La capacità di NP di passare attraverso le barriere epiteliali del corpo (mucosa gastrointestinale compresa) è stata dimostrata per mezzo di nuove tecniche di microscopia elettronica e l'uso della spettroscopia ha permesso di identificare la chimica delle particelle e in molti casi anche la loro origine.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivi del progetto consistono nella messa a punto e standardizzazione di metodologie di caratterizzazione chimico fisica di varie tipologie di NP, e di studio delle caratteristiche di comportamento in tessuti biologici, in organi, in organismi. Le NP verranno caratterizzate negli aspetti chimico, fisici, biologici e si cercherà di determinare il grado di compatibilità biologica e di tossicità. Questo risultato è basilare per la verifica delle possibili applicazioni sia diagnostiche che terapeutiche.

Trasferibilità dei risultati

L'esperienza di analisi e caratterizzazione può fornire sostegno alle autorità regolatorie in un campo nuovo e che certamente sta prendendo forza nell'immediato, e potrebbe costituire una prima casistica storica unitaria, per approcci e approfondimenti.

Correlazioni fra caratteristiche chimico-fisiche ed effetti biologici del particolare fine

Sono stati individuati i seguenti temi di indagine:

Caratterizzazione chimico-fisica delle principali componenti presenti nelle frazioni granulometriche del PM10 mediante tecniche di microscopia elettronica a scansione e microanalisi X con spettroscopia a dispersione di energia; classificazione mediante metodi di analisi multivariata (*hierarchical cluster analysis* e *principal factor analysis*) delle particelle in tipologie omogenee. Valutazione delle abbondanze di radicali di interesse tossicologico (SO₄²⁻, NH₄⁺) e di cationi metallici nelle componenti fine e ultrafini del particolato mediante spettroscopia XPS (spettroscopia di foto elettroni).

Determinazione quantitativa delle specie acide e del loro rapporto con il particolato fine e ultrafine.

Studio della correlazione tra composizione chimica delle particelle e risposta infiammatoria macrofagica dopo esposizione acuta e cronica delle cellule a campioni di particolato urbano.

Studio delle modificazioni indotte dal PM10 sulle funzioni e sulle strutture cellulari con particolare riferimento alla membrana plasmatica e ad organuli intracellulari quali i mitocondri, il citoscheletro, il nucleo, l'apparato del Golgi e il reticolo endoplasmatico.

Studio dei processi di internalizzazione del PM10, delle alterazioni funzionali e della citotossicità indotta da questo inquinante utilizzando linee fagocitiche quali cellule epiteliali e macrofagi.

Risultati attesi nel triennio

Correlazione dei dati relativi alla composizione e alle caratteristiche chimico-fisiche delle frazioni granulometriche del particolato aerodisperso con l'attività biologica e la tossicità.

Costruzione di sistemi di rivelazione avanzati in campo medico

Obiettivo principale è la messa a punto di prototipi di rivelatori in grado di permettere l'individuazione di tumori molto piccoli (possibilmente < 5 mm). Si è già mostrato che miglioramenti delle tecniche, anche le più recenti, sono possibili. Si tratta di ottimizzare le tecniche di rivelazione innanzitutto mediante la scelta di scintillatori e fotorivelatori di caratteristiche opportune per massimizzare le prestazioni per le specifiche applicazioni biomediche. Si continuerà nel 2006 (e possibilmente negli anni seguenti, se i finanziamenti lo consentiranno) la sperimentazione clinica già iniziata in collaborazione con le cliniche universitarie di Roma Tor Vergata e di Napoli (Università e CNR) nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero della Sanità (progetto 1%) mediante i sistemi di rivelazione costruiti e suscettibili di ulteriori miglioramenti. Si possono infatti studiare e mettere in atto tecniche di collimazione, di elettronica, acquisizione ed elaborazione dei dati in grado di ottimizzare le

prestazioni dei rivelatori per gli specifici scopi. Essenziale è la massimizzazione dell'SNR (*Signal to noise ratio*), del contrasto, della risoluzione spaziale e della risoluzione energetica. Ciò sarà consentito dall'uso di nuovi scintillatori recentemente apparsi sul mercato (LaBr₃), dalla messa a punto di tecniche di collimazione *ad hoc* (aperture codificate, *multi pin hole* ecc.) e di sistemi di acquisizione e elaborazione dati particolarmente sofisticati messi a punto per ricerche di fisica nucleare delle alte energie. Alcune di queste tecniche richiederanno progetti *ad hoc*. Si metterà a punto un secondo rivelatore da usare insieme al primo per misure con modalità *dual detector* che consentirà sia un aumento della sensibilità che l'uso di tecniche di focalizzazione su punti specifici con potenziali vantaggi in termini di risoluzione e quindi, in linea di principio, di individuazione di strutture molto piccole. Si intende anche confrontare le tecniche di *imaging* planare con quelle tomografiche (*single photon*). La tecnica tomografica è infatti in linea di principio migliore per la migliore sensibilità di contrasto ottenibile. Si perde in questo caso però il vantaggio legato alla compressione della mammella che consente di avvicinare il rivelatore all'organo e migliorare quindi la risoluzione spaziale. L'uso di queste tecniche consente in linea di principio modalità di esecuzione delle misure più confortevoli per il paziente, con possibilità quindi di misure più lunghe con vantaggi in termini di statistica e quindi di SNR. Si esaminerà la possibilità di utilizzare radiofarmaci con *uptake* maggiore rispetto a quello utilizzato finora (Sestamibi) con vantaggi che potrebbero essere decisivi nella rivelazione di tumori molto piccoli. Uno di essi, la Bombesina è nella fase finale di sperimentazione in diversi Laboratori anche europei e potrebbe essere disponibile a breve. Si sta pensando inoltre allo studio di un problema più complicato della diagnosi del cancro della mammella, la diagnosi precoce del cancro della prostata. Le tecniche di rivelazione sono dello stesso tipo ma il tipo di tumore, la distanza dal rivelatore (si tratta di un organo interno), le condizioni non favorevoli del fondo rendono il problema molto più complicato. La auspicata disponibilità di *Bombesina* avrebbe un ruolo molto importante. La costruzione di tali rivelatori richiederà però la attivazione progetti di ricerca e sperimentazione clinica specifici con finanziamenti del Ministero della Sanità o della Comunità Europea.

Risultati attesi nel triennio

Il programma di ricerca proseguirà come descritto. I risultati conseguiti con i primi *trial* clinici sono molto incoraggianti. L'uso della tecnica *dual detector*, di rivelatori con caratteristiche ulteriormente ottimizzate sia per quanto riguarda le caratteristiche intrinseche che i sistemi di collimazione, il confronto con le tecniche tomografiche consentirà la scelta da proporre per l'uso clinico di *routine*. I costi e la complessità avranno un ruolo non secondario nella scelta. Aspetto fondamentale è quello relativo alle disponibilità di finanziamenti e personale adeguato.

Trasferibilità dei risultati

Si costruirà un sistema di rivelazione di elevate prestazioni in termini di risoluzione spaziale, contrasto e rapporto segnale rumore ottimizzato per la rivelazione di tumori piccoli, possibilmente minore di 5 mm. Tale sistema di rivelazione opportunamente ingegnerizzato potrà essere proposto per il trasferimento all'industria e quindi diffuso nelle strutture sanitarie nazionali.

Costruzione e prova di acceleratore lineare per protoni per produzione di radioisotopi e prototerapia oncologica

In continuità con il sottoprogetto del programma TOP che si è occupato di acquisire l'iniettore, costruire la linea di fascio e il primo modulo di accelerazione, si vuole dimostrare la operabilità dell'iniettore quale produttore di radioisotopi PET per un'utenza ospedaliera verificando la resa operativa del sistema, una volta ottimizzato, e confrontandola con quella dei

sistemi già in uso. Si deve inoltre dimostrare la rispondenza dei moduli di accelerazione alle specifiche progettuali e realizzare, a seguito dei risultati ottenuti, moduli di accelerazione successivi per innalzare l'energia finale del fascio giungendo ad un'energia che dipenderà dai finanziamenti disponibili.

Risultati attesi nel triennio

Validazione dello schema magnetico per il trasporto del fascio che ottimizzi la resa di produzione. Confronto con la produzione di radioisotopi ottenuta nei ciclotroni utilizzati per la PET in vari centri ospedalieri. Prove di accelerazione nei moduli SCDTL. Mappe dosimetriche nei vari modi di funzionamento dell'iniettore e dei moduli di accelerazione.

Trasferibilità dei risultati

Il sistema, una volta provato e messo a punto, può essere trasferito in ambiente ospedaliero e utilizzato per produrre radioisotopi PET. Se si ottengono finanziamenti sufficienti, l'energia del fascio può essere innalzata fino a permettere il trattamento dei melanomi oculari e successivamente di tumori più profondi.

Dinamica del DNA: modelli teorici e simulazioni numeriche

Questa attività è centrata sull'impiego di approcci computazionali, tipici degli studi in campo fisico, a problemi di interesse biologico e biomedico. L'obiettivo è la caratterizzazione dei processi dinamici che accompagnano e rendono possibile il fenomeno della trascrizione del DNA. La catena molecolare del DNA viene rappresentata in modo semplificato; infatti, nel lavoro svolto finora, i modelli utilizzati hanno uno o due gradi di libertà per ogni coppia di basi complementari. Dal punto di vista dinamico, la "bolla" di trascrizione, ossia l'apertura parziale del DNA nella zona che in quel momento viene trascritta, è vista come un'eccitazione localizzata; quindi il procedere della trascrizione è associato all'avanzamento di questa eccitazione. I sistemi non lineari possono sostenere, sotto opportune condizioni, la propagazione di pacchetti localizzati di energia praticamente senza dispersione. Ciò riproduce qualitativamente l'aspetto principale dell'evoluzione dinamica associata alla trascrizione. Lo scopo di questa attività è lo studio di modelli di DNA progressivamente più completi e realistici. I modelli saranno studiati con simulazione numerica, e per quanto possibile con approcci analitici. Questa ricerca rappresenta la prosecuzione di un'attività già da tempo avviata in collaborazione con l'Università di Roma "La Sapienza".

Risultati attesi nel triennio

Il punto principale è lo studio della robustezza delle proprietà dinamiche, requisito essenziale per la trascrizione. In particolare occorre verificare se il trasporto di energia senza apprezzabile dispersione avviene anche in presenza di rumore termico. Altro aspetto importante da stabilire è che anche una variazione, entro certi intervalli, dei parametri che descrivono le interazioni tra i diversi gradi di libertà, non deve distruggere la proprietà di trasporto coerente di energia. Di conseguenza, l'obiettivo principale delle simulazioni sarà quello di confrontare, da questo punto di vista, modelli che si distinguono per la rappresentazione degli aspetti principali delle interazioni all'interno della doppia elica del DNA. Verranno anche studiate, nell'ambito di questi modelli, le proprietà di riconoscimento di sequenze specifiche.

Dispositivi medici impiantabili attivi e risonanza magnetica: studio delle interazioni e dei rischi per i pazienti

In molti Paesi la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) è preclusa ai pazienti portatori di dispositivi medici impiantabili attivi (*pacemaker*, PM; defibrillatori impiantabili ICD; stimolatori neurali e spinali). I potenziali rischi associati a indagini RMN in pazienti con su dispositivi medici

impiantabili sono: effetti di forza e torsione sulle componenti ferromagnetiche dei dispositivi per effetto dell'elevato campo magnetico statico; conseguenze derivanti da inopportuna stimolazione elettrica ed effetti di riscaldamento localizzati sulla punta di cateteri. Il campo a radiofrequenza (RF) usato nelle procedure di RMN può indurre correnti di densità relativamente elevate all'interno di componenti metalliche. A causa della limitata conducibilità elettrica tipica di molte strutture biologiche queste correnti determinano un certo riscaldamento dei tessuti circostanti l'impianto metallico. Questo fenomeno è stato documentato da alcuni gruppi di ricercatori, ma uno studio sistematico dei fattori più rilevanti ai fini del riscaldamento (geometria dell'impianto, tipo di dispositivo) non è stato ancora effettuato. D'altra parte, altri gruppi, sulla base degli esigui effetti di riscaldamento osservati nei loro esperimenti, hanno affermato che la RMN può essere sicura anche per i portatori di dispositivi impiantabili.

Risultati attesi nel triennio

I principali obiettivi dell'attività di ricerca sono:

Sviluppo di una procedura *standard* e affidabile per la misura del riscaldamento degli impianti metallici per mezzo di un termometro fluoroscopico e per la stima della misura dell'errore associato.

Studio degli effetti della geometria dell'impianto sul riscaldamento.

Sviluppo di un modello numerico per descrivere il riscaldamento in funzione della geometria dell'impianto, delle caratteristiche del materiale e del tipo di sequenza RMN.

Attraverso simulazioni numeriche e misure sperimentali sarà studiata la posizione migliore per il piazzamento delle sonde ottiche. La durata di questa fase sarà di circa un anno. Parallelamente verranno sviluppati algoritmi per la simulazione numerica degli effetti di riscaldamento. In particolare verrà messo a punto un modello di bobina *bird-cage* a 64 MHz e un modello numerico antropomorfo basato su dati realistici (*human visible data set*). Successivamente verrà condotta una campagna di misure in RMN per la raccolta di dati definitivi e per la validazione dei modelli numerici studiati.

Trasferibilità dei risultati

In ambito industriale, i modelli numerici di calcolo per la predizione del riscaldamento indotto sono uno strumento di lavoro innovativo che si sta affermando sia nelle fasi di progetto che in quelle di verifica e controllo. Rappresentano dunque uno strumento che avrà larga diffusione nei prossimi anni, sia nell'ambito produttivo che in quello dei controlli post-produzione e post immissione sul mercato. Per il Sistema Sanitario Nazionale, l'immissione sul mercato di dispositivi medici impiantabili attivi per i quali sia stato possibile verificarne la compatibilità con sistemi di risonanza magnetica permetterebbe a una significativa porzione di pazienti impiantati di usufruire degli indiscutibili vantaggi diagnostici che questa metodica già ha dimostrato di apportare. Per l'Istituto Superiore di Sanità, questa ricerca consentirà l'aggiornamento scientifico e la messa a punto di strumenti di controllo in un settore particolarmente dinamico dei dispositivi medici, quale quello rappresentato dai dispositivi impiantabili attivi.

Dosimetria in radioterapia

Nonostante la dosimetria in radioterapia sia una disciplina in larga misura consolidata, l'introduzione di tecniche altamente conformazionali quali IMRT, IORT, Stereotassi, protonterapia, 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 posto problematiche nuove dal punto di vista dosimetrico, alle quali i dosimetri usati tradizionalmente in radioterapia non sono in grado di rispondere e vengono quindi richieste soluzioni adeguate. La presente attività di ricerca è incentrata sullo sviluppo e

caratterizzazione di sistemi potenzialmente idonei a fornire una soluzione ai problemi specifici posti dall'uso di tecniche speciali. L'indagine viene eseguita sia su sistemi commerciali che non, determinandone caratteristiche e limiti, individuando la loro utilizzazione nell'applicazione alla dosimetria di base e clinica di queste tecniche. Tra i vari sistemi dosimetrici investigati, quelli sui quali l'interesse è maggiormente focalizzato sono: alanina, TLD, diamante naturale e diamante sintetico cresciuto con tecnica di *Chemical Vapour Deposition*.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione delle condizioni e dei limiti di utilizzo dei rivelatori investigati per la dosimetria di base e clinica nell'IMRT. Determinazione delle proprietà dei sistemi dosimetrici investigati e loro caratterizzazione in fasci IMRT. Sviluppo e ottimizzazione dei sistemi dosimetrici a base di diamante CVD. Determinazione di fattori correttivi per la dosimetria di base con applicatori IORT.

Trasferibilità dei risultati

I risultati attesi sono di utilizzo presso i Centri di Radioterapia per una corretta dosimetria dei campi utilizzati nei trattamenti conformazionali e nella IORT. L'industria può avvalersi delle caratterizzazioni dosimetriche dei rivelatori CVD in sviluppo per la produzione e ingegnerizzazione di un prodotto commerciale.

Elettronica per applicazioni di *imaging* molecolare in biomedicina

Da diversi anni sono in corso nel reparto di Fisica e Tecnologie Nucleari per la Salute attività di ricerca nell'ambito della medicina nucleare finalizzate alla realizzazione di sistemi di *imaging* molecolare applicato alla diagnosi medica di patologie umane e allo studio su piccoli animali.

Tali sistemi sono essenzialmente composti da un rivelatore di fotoni di alta energia (centinaia di keV), un'elettronica di acquisizione dei segnali elettronici prodotti dal rivelatore, un *software* di processamento dei dati e una struttura meccanica.

Il presente progetto intende sviluppare, in collaborazione con gruppi dell'INFN, il dipartimento di microelettronica del politecnico di Bari ed esperti del CERN e di Jefferson Lab, una nuova elettronica di acquisizione, che presenti le seguenti caratteristiche principali (derivanti dalle esigenze emerse in questi anni):

- lettura indipendente di almeno 4096 canali simultaneamente
- logica di *multiplexing* dei canali per ridurre costi e ingombri
- capacità di generare internamente il *trigger* di acquisizione (sulla base dei segnali presenti sui canali di *input*)
- velocità di acquisizione non inferiore a 10000 eventi al secondo (ogni eventi con molteplicità media di 100 canali)
- accoppiamento ottimale con l'uscita di fotomoltiplicatori multianodici e al silicio
- sufficiente flessibilità per potersi adattare (con minime modifiche) ad applicazioni che richiedano rivelatori futuri.
- interfacciamento *standard* (USB/*Firewire*) al computer che provvederà alla gestione dell'elettronica e alla raccolta dei dati.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto intende svilupparsi come segue:
nei prossimi 10-12 mesi si finalizzeranno i requisiti dell'elettronica (già in larga parte definiti), si provvederà alla progettazione del *chip* di *front-end* (che rappresenta il componente più importante dell'elettronica) e della logica di controllo (per la quale si intende riutilizzare - per quanto possibile - uno schema già realizzato per altri scopi).

Nei successivi 6 mesi, si realizzerà il primo *run* del *chip* e quindi si provvederanno i *test* per caratterizzarne il funzionamento e quindi per valutare e definire eventuali migliorie da apportare, che condurranno all'esecuzione del secondo *run* di realizzazione del *chip*.

Nei successivi mesi si installerà l'elettronica a un sistema per PET (o *Compton Camera*) già sviluppato e se ne valuteranno i benefici.

Al termine del progetto si dovrebbe essere in possesso di un'elettronica di acquisizione con caratteristiche, in termini di sensibilità, prestazioni temporali, compattezza e costi, al momento non esistenti sul mercato.

Trasferibilità dei risultati

L'elettronica in oggetto è applicabile innanzitutto a sistemi per la medicina nucleare più tradizionale come Scintimammografia, SPECT e PET, e sperimentali quali la *Compton Camera*.

Più in generale, può trovare applicazione in tutti quei sistemi di rivelazione in cui è richiesta la rapida (decine di microsecondi) lettura di un elevato (migliaia) numero di canali in poco spazio.

Fisica nucleare e sue applicazioni alla biomedicina

Si prevede di continuare negli anni 2006-2008 l'attività intrapresa con lo studio sperimentale di reazioni di grande interesse anche per i risvolti applicativi, quali, per esempio, la spettroscopia ipernucleare, e lo studio della violazione di parità, in cui il gruppo di fisica nucleare dell'ISS ha un ruolo di *leadership*. Tale attività è finanziata tradizionalmente dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare nell'ambito della convenzione con l'ISS in vigore ormai da decenni. Questa attività richiede il progetto e la costruzione di complessi apparati sperimentali che hanno fornito e forniscono, da sempre, il necessario *know how* per le applicazioni in campo bio-medico delle tecniche di imaging con radionuclidi che hanno grande importanza in campo biomedico per la loro elevatissima sensibilità e specificità per lo studio di processi biologici *in vivo*. Si deve quindi continuare questa attività di ricerca sugli apparati sperimentali, in particolare sui fotorivelatori. Sono per questo necessari studi "di base" svincolati da obiettivi specifici e di breve periodo, che pure si perseguono. Sono fondamentali, in questo ambito, le collaborazioni costituite nel corso degli anni con istituzioni e laboratori europei, americani e giapponesi. In particolare si vuole rafforzare e possibilmente istituzionalizzare la collaborazione con il *Johns Hopkins*, NIH, il CERN, il *Jefferson Lab* e che si è dimostrata per molti aspetti, cruciale.

Risultati attesi nel triennio

Si dovrebbe completare la presa dati sugli esperimenti in cui il gruppo ha la *leadership*. La parte di studio su apparati di rivelazione continuerà nelle direzioni indicate e sarà guidata dai risultati delle ricerche condotte nel 2004 e 2005. I risultati preliminari sono molto buoni. Fondamentale è a questo proposito la disponibilità di supporto finanziario e di personale per gli aspetti legati alle attività applicative "di base". Si approfondirà, tra l'altro, in collaborazione con il CERN e l'INFN, lo studio delle prestazioni dei fotorivelatori HPD (fototubi ibridi) messi a punto dal CERN, per applicazioni sia in ambito SPECT (*Single Photon Computer Tomography*) che PET (*Positron Emission Tomography*). Si pensa di estendere e ampliare le convenzioni e *Memorandum of Agreement* in parte già attivate con alcune istituzioni (*Jefferson Lab*, *Johns Hopkins*, NIH).

Trasferibilità dei risultati

Le attività di ricerca descritte portano al progetto e costruzione di prototipi di rivelatori per applicazioni sia in biologia (studi di processi biologici di base anche *in vivo* su piccoli animali) che in medicina (rivelatori dedicati a scopi specifici, per esempio diagnosi precoce di tumori (mammella, prostata ecc.) da utilizzare in clinica. Per questo occorre però attivare progetti

specifici in collaborazione con istituti e strutture di ricerca italiane e internazionali per la necessaria validazione anche clinica quando necessario.

Imaging molecolare con radionuclidi per lo studio di processi biologici *in vivo*

È sempre più frequente l'utilizzo di modelli animali, di varia complessità per lo studio di malattie e processi biologici di base *in vivo*. Tale studio ha avuto negli anni recenti un grande impulso per la possibilità di applicare i metodi della biologia molecolare e cellulare allo studio della cura delle malattie dell'uomo. La recente disponibilità di piccoli animali, specie topi che "simulano" in modo credibile le malattie dell'uomo hanno reso evidente la necessità di disporre di tecniche di *imaging* sempre più sofisticate, in grado di costruire immagini per lo studio di dettaglio della evoluzione di malattie. Sono evidenti inoltre i vantaggi dello studio dinamico possibile con alcune delle tecniche di *imaging*. Tutto ciò ha generato un enorme interesse per l'*imaging* di piccoli animali mediante tecniche con radionuclidi. Le malattie sono infatti processi biologici e l'*imaging* molecolare con radionuclidi consente di ottenere informazioni fondamentali sugli stessi. Alcuni processi avvengono senza cambiamenti anatomici e morfologici evidenziabili generalmente mediante tecniche quali MRI e CT. È necessario però che si disponga del sistema di rivelazione adatto. Il progetto e la costruzione di tali rivelatori è infatti molto difficile per le elevate prestazioni richieste in termini di risoluzione spaziale e sensibilità, date le dimensioni delle strutture da evidenziare e studiare. Tra i processi biologici che si intende studiare con questo progetto particolarmente importante appare lo studio della rivelazione di placche aterosclerotiche in topi transgenici. L'importanza di tali studi per l'uomo è evidente se tiene presente l'enorme impatto delle malattie aterosclerotiche, specie nel mondo occidentale, e il legame con le malattie cardiache (specialmente infarto del miocardio) e del cervello (ictus). Lo studio di questi problemi e dei rivelatori necessari è iniziato da tempo, anche nell'ambito di un progetto in collaborazione con il *Johns Hopkins Hospital* di Baltimora dove studiano questi problemi nell'ambito di progetti finanziati dall'NIH. L'apporto del nostro gruppo è consistito nella costruzione di un prototipo di elevate prestazioni in termini di risoluzione spaziale e sensibilità, evoluzione di sistemi messi a punto recentemente per altri scopi (diagnosi del tumore della mammella) e anche in collaborazioni con altre istituzioni (*Jefferson Lab*). La sperimentazione in collaborazione è iniziata di recente con misure nella *facility small animal* del JHU, con fantocci e animali. Si sono eseguite le scorse settimane, misure con diversi traccianti per processi biologici differenti per *test* sulle prestazioni del rivelatore. Data la indisponibilità al momento di topi transgenici con placche quindi indotte geneticamente, si sono eseguite misure su topi "di controllo" ma alimentati con cibi grassi e quindi potenzialmente in grado di sviluppare placche aterosclerotiche. I dati sono in elaborazione. Le misure eseguite con fantocci hanno dimostrato le ottime prestazioni del sistema e le potenzialità dello stesso. Sono evidenti per altro i limiti già noti per uno studio sistematico dei processi descritti e le direzioni in cui muoversi per un possibile miglioramento del sistema. Si deve innanzitutto costruire un rivelatore di dimensioni maggiori per la necessità di uso di tecniche di collimazione *pin hole* o multi *pinhole* o aperture codificate, con conseguente riduzione del *Field of View*. Bisogna costruire un *dual detector* con FOV diversi, uno che fa l'immagine di tutto l'animale, l'altro, con FOV più piccolo ma risoluzione migliore per focalizzare le zone di maggior interesse. Lo studio deve proseguire con un sistema adatto per l'indispensabile studio tomografico, con uno o più rivelatori attorno all'animale per consentire maggiore sensibilità e studi quantitativi. Va studiato accuratamente il *layout* del sistema e la sua ottimizzazione. La risoluzione spaziale va ulteriormente migliorata con fotorivelatori del tipo *Multi Channel Plates* (MCP) che consentono un campionamento ottimale della luce generata nella interazione dei raggi gamma con lo scintillatore e quindi prestazioni migliori in termini di risoluzione spaziale, parametro critico in questo tipo di studi (è necessaria una risoluzione

spaziale di ~ 500 micron per evidenziare le strutture di interesse). L'uso di tali fotorivelatori comporta l'uso di una elettronica in grado di acquisire con velocità adeguata un gran numero di canali (~5000). Tale elettronica, evoluzione del sistema attualmente utilizzato è in fase di progetto. È evidente che per portare avanti il progetto sono necessari ulteriori finanziamenti.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio effettuato con il prototipo consentirà di definire i parametri del sistema di rivelazione finale e le dimensioni dei finanziamenti necessari anche in termini di *manpower*. Sarà possibile una valutazione di fattibilità delle misure che evidenzino la possibilità di rivelare placche *vulnerable* e quindi potenzialmente in grado di generare eventi clinici. La collaborazione in atto con il JHU sarà rafforzata ed estesa.

Trasferibilità dei risultati

Recenti progressi nella comprensione della biologia e fisiopatologia delle malattie aterosclerotiche hanno reso evidente l'inadeguatezza delle tecniche in uso. Sono dunque necessarie nuove tecniche, segnatamente quelle che fanno uso di radionuclidi, che essendo dotate di grande sensibilità e specificità per lo studio dei processi metabolici coinvolti, consentono in linea di principio, notevoli progressi nella comprensione e quindi nella diagnosi e prognosi di tali malattie. È importante infatti non solo e non tanto essere in grado di individuare pazienti con *atheroma* (possibile anche con altre tecniche) ma le specifiche lesioni potenzialmente in grado di causare eventi clinici. Questo è possibile, in linea di principio con tecniche in grado di fornire informazioni sugli eventi biologici che determinano il rischio di rottura delle placche (*vulnerable plaques*). I risultati ottenuti con il prototipo e possibilmente (se ulteriori finanziamenti lo consentiranno) con il rivelatore "finale" dovrebbero consentire di fissare uno *standard* per le misure planari e tomografiche (*Single Photon Emission Tomography* (SPECT) su piccoli animali. La comprensione delle prestazioni del sistema gli studi su animali e conseguente comprensione dei fenomeni biologici dovrebbero consentire la definizione delle caratteristiche, del *layout*, del ruolo e delle modalità di uso di tali sistemi per la diagnosi delle malattie aterosclerotiche nell'uomo.

Influenza del fondo di radiazioni sulla risposta cellulare

A tutt'oggi vi sono pochi dati sulla risposta biologica a un'esposizione protratta a bassi ratei di dose, come quella dovuta al fondo naturale di radiazioni, che potrebbe, esso stesso, influenzare la risposta delle cellule ad esposizioni acute a radiazioni ionizzanti.

Obiettivo del presente progetto è quello di valutare l'influenza del fondo naturale di radiazione sulla funzionalità e sulla risposta ad agenti genotossici di cellule di mammifero in coltura. In particolare sarà valutata la possibilità che il fondo naturale possa condizionare la cellula in modo da renderla più resistente a successive esposizioni acute a radiazioni ionizzanti (risposta adattativa). La galleria dei Laboratori Nazionali del Gran Sasso (LNGS) dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), situata 1400 m sotto la vetta della montagna del Gran Sasso, offre un'ottima opportunità di studiare gli effetti di una riduzione significativa dell'esposizione dovuta al fondo naturale di radiazioni avendo un'eccellente protezione dai raggi cosmici e dai neutroni. Verranno confrontate le risposte delle cellule coltivate in parallelo nella galleria e presso i laboratori esterni dei LNGS, cioè in presenza di un fondo "normale" di radiazione.

Verrà inoltre sviluppato un modello matematico sugli effetti biologici delle basse dosi che tenga conto anche della risposta adattativa.

Risultati attesi nel triennio

- Informazioni sulla risposta di cellule di mammifero, cresciute per lungo tempo (sino a 9 mesi) nelle due diverse condizioni di fondo di radiazioni, ad esposizioni acute a raggi gamma o X, in termini di:
 - induzione di mutazioni;
 - danno al DNA;
 - induzione di apoptosi;
 - espressione dei geni coinvolti nella riparazione del DNA, nell'arresto del ciclo cellulare e nell'apoptosi.
- Sviluppo di modelli matematici della risposta cellulare tramite simulazioni basate sulla Dinamica Molecolare.

Trasferibilità dei risultati

Il modello utilizzato per la valutazione del rischio a basse dosi di radiazioni è quello dell'estrapolazione lineare dai risultati ottenuti ad alte dosi a quelli aspettati a basse dosi. Esistono però ancora molte incertezze sull'andamento delle curve dose-risposta a bassi livelli di radiazione, in quanto i dati sperimentali oggi disponibili mostrano che la reazione delle cellule alle basse dosi è molto complessa. La valutazione quindi degli effetti biologici di basse dosi di radiazioni ionizzanti è importante non solo per una miglior comprensione del ruolo del fondo naturale di radiazioni nell'evoluzione della vita sulla terra ma anche per la valutazione dei rischi da esposizioni croniche occupazionali.

Il trasferimento dei risultati avverrà prevalentemente attraverso pubblicazioni scientifiche e relazioni a congressi scientifici, nonché mediante gli strumenti informatici dell'ISS.

Influenza del laser sul tessuto osseo e sui tessuti dentali

L'introduzione dei trattamenti laser sui tessuti dentali si sta dimostrando di particolare validità e di interessante atraumaticità in particolare nei settori:

della conservativa, dove l'utilizzo del laser sembra portare a un'attivazione maggiore delle superfici interessate; infatti, usato ad es. al posto della mordenzatura delle superfici dello smalto e della dentina, migliora l'adesione dei tessuti ai materiali utilizzati per le ricostruzioni;

dell'endodonzia, dove l'utilizzo del laser consente una preparazione più selettiva e più sterile della dentina con rimozione atraumatica delle carie anche più profonde, eliminando i batteri dalle pareti interne del canale radicolare e riducendo la permeabilità della dentina intracanalare.

dell'implantologia, dove l'effetto emostatico del laser permette un campo chirurgico privo di sangue e anche una ridotta necessità di anestetico, durante la preparazione del sito implantare.

La presente attività di ricerca intende approfondire le conoscenze sugli effetti dei trattamenti *laser* per mezzo di una tecnica innovativa quale la microtomografia tridimensionale computerizzata. Tale tecnica, non invasiva e non distruttiva, consente l'esame della struttura tridimensionale degli elementi dentali e una discriminazione dei diversi tessuti che li compongono, tramite le informazioni densitometriche con cui vengono generate le immagini.

La microtomografia tridimensionale computerizzata, affiancandosi ad altre tecniche tradizionali quali la microscopia elettronica a scansione e quella istologica, si prevede possa fornire quadri morfologici di grande rilevanza. In questo quadro sarà particolarmente interessante valutare se il trattamento laser effettuato sulla superficie dei supporti per implantologia dentale e/o del sito implantare possa contribuire all'ottimizzazione del processo di osteointegrazione

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale di quest'attività di ricerca è quello di utilizzare la microtomografia tridimensionale computerizzata allo scopo di indagare gli effetti del trattamento *laser* sui tessuti

dentali, lo smalto, la dentina e l'osso, osservati e studiati fino adesso con strumentazione tradizionale (SEM, RX, ecc.)

La microtomografia tridimensionale è una forma miniaturizzata della tomografia assiale computerizzata, meglio nota come TAC, non è distruttiva, non è invasiva e viene usata per creare mappe tridimensionali di piccoli campioni, di dimensioni di poco più di un centimetro, con una risoluzione dell'ordine di 8 micron. È molto utile per lo studio tridimensionale dei tessuti duri, quali l'osso, poiché fornisce informazioni anche sulla struttura e la concentrazione dei minerali. Le immagini che si ottengono vengono ricostruite dall'insieme di superfici di sezioni piane, che sono state acquisite e elaborate durante la scansione del campione, e che possono anche essere usate per fornire informazioni di tipo morfologico e densitometrico.

L'attività sarà articolata secondo le seguenti fasi operative:

Preparazione di campioni di elementi dentali e di sezioni di osso, irraggiati con due tipi di *laser* attualmente più utilizzati quali Nd:YAG e Er:YAG a differenti livelli di energia e potenza;

Osservazioni di campioni, prima e dopo l'irraggiamento *laser*, alla microtomografia tridimensionale;

Comparazione delle ricostruzioni tridimensionali e bidimensionali della microtomografia con immagini ottenute da osservazioni al SEM e analisi istologiche

Trasferibilità dei risultati

Lo studio degli effetti *laser* sui tessuti dentali risulta particolarmente interessante per conoscere la profondità delle penetrazioni della radiazione *laser* in base alla diversa potenza di ablazione, e anche delle eventuali alterazioni provocate dal riscaldamento elevato e focalizzato prodotto dalle diverse intensità di irraggiamento. Quando questo tipo di informazioni sarà pienamente e soddisfacentemente indagato con risultati positivi per la salute dei tessuti e degli elementi dentali dei pazienti, si potrà supportare la diffusione di tale metodica, non sottovalutando assolutamente la sua atraumaticità nell'applicazione.

Interconfronti dosimetrici

Gli interconfronti dosimetrici multicentrici costituiscono un potente strumento per la valutazione dell'affidabilità e dell'uniformità della dose somministrata nelle varie situazioni operative presso i Centri di Radioterapia e hanno come obiettivo l'individuazione e successiva riduzione e/o eliminazione delle cause di incertezza sistematica della dose somministrata al volume di trattamento. La presente attività è prevalentemente incentrata sull'organizzazione gestione ed esecuzione di interconfronti dosimetrici volti a verificare l'accuratezza della dose somministrata sia nel caso di terapie convenzionali che fanno uso fasci di fotoni di alta energia che nel caso della tecnica speciale IORT (*Intra Operative RadioTherapy*) che utilizza fasci di elettroni ad elevato rateo di dose. Gli interconfronti multicentrici proposti si caratterizzano per due importanti aspetti: l'utilizzo dell'alanina come dosimetria di riferimento e la possibilità di simulare trattamenti reali su fantoccio antropomorfo, al fine di effettuare una valutazione dell'intero processo radioterapico. Un ulteriore aspetto del processo radioterapico, che si intende prendere in considerazione, è quello relativo alle verifiche dosimetriche di piani trattamento nella tecnica a intensità modulata (IMRT) su fantoccio antropomorfo utilizzando l'alanina come riferimento e i TLD per misure relative.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione su scala nazionale del livello di accordo fra la dose dichiarata da ciascun Centro di Radioterapia e la dose misurata con alanina e TLD, sia in trattamenti convenzionali con fasci di fotoni che nel trattamento speciale IORT. Determinazione del livello di accuratezza dei piani di trattamento in IMRT. Valutazione delle azioni correttive in caso di superamento delle tolleranze.

Trasferibilità dei risultati

Il dato dosimetrico misurato dall'ISS viene inviato in via ufficiale e può venire usato da ciascun Centro di Radioterapia per la definizione e applicazione di azioni correttive quali, ad esempio, la determinazione di fattori correttivi al valore di dose per unità monitor misurata dal Centro e correntemente in uso presso il Centro medesimo.

La telemedicina per il miglioramento della cura

La telemedicina offre una soluzione alla crescente domanda di assistenza medica, generata dall'aumento delle malattie croniche, dovuto sia all'invecchiamento della popolazione che alla crescente sopravvivenza da patologie gravi. Di particolare importanza è la teleriabilitazione motoria, che può garantire trattamenti tempestivi e per tempi lunghi, essenziali per un buon esito.

Attualmente il Reparto è coinvolto nei tre seguenti progetti, con responsabilità di coordinamento nei primi due.

- 1) HELLODOC, *European programme eTen*, termine 31/08/06. Per la validazione di un sistema per la teleriabilitazione di pazienti affetti da *stroke*, sclerosi multipla e traumi cranici.
- 2) ITACA (Infrastruttura telematica d'Area per la Continuità dell'Assistenza sanitaria), FIRB, MIUR, termine 31/07/06. Obiettivi particolari: studio di modelli per un ridisegno del sistema di erogazione dei servizi sanitari, progetto e prototipizzazione di apparati per l'erogazione di servizi di teleriabilitazione.
- 3) "Tele-ecocardiografia sul territorio"; Ministero Salute, coordinatore: IRCCS Fondazione Maugeri, termine 12/2005. Studio di un sistema per la valutazione della qualità delle immagini provenienti da ecocardiografo.

Per il triennio 2006-2008 si intende proseguire sui temi dei primi due progetti, con enfasi sugli aspetti più propriamente riabilitativi. Inoltre si studierà la possibilità di intraprendere un'attività di valutazione di efficacia e appropriatezza di sistemi e servizi di telemedicina.

Risultati attesi nel triennio

Nuovi modelli organizzativi dei sistemi sanitari per una più efficiente erogazione dei servizi avvalendosi delle potenzialità delle tecnologie della informazione e delle telecomunicazioni e in particolare della telemedicina. Apparati, e proposte di apparati, per la realizzazione di servizi di teleriabilitazione che siano facilmente adattabili alle diverse e mutevoli esigenze dei pazienti e che facciano a questi percepire la (tele)presenza del personale di assistenza (medici, infermieri).

Eventuale progetto per un'attività di valutazione di efficacia e appropriatezza di apparecchiature e ortesi per la riabilitazione.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati può essere alta svolgendo progetti in collaborazione con centri clinici qualificati e industrie competenti nel settore.

I centri clinici permettono una validazione sul campo della strumentazione e dei servizi proposti. Le industrie possono provvedere allo sviluppo industriale dei prodotti. Allo scopo sarà, come in passato, presa in considerazione la brevettazione dei dispositivi e sistemi ideati.

Si curerà inoltre la pubblicazione dei risultati su riviste a diffusione internazionale e la formazione dei potenziali fruitori attraverso *workshop* e piattaforme per la formazione a distanza (*e-learning*). Degno di nota è lo sviluppo e l'implementazione, nell'ambito del citato progetto europeo HELLODOC, di un sistema apposito di teleformazione per gli operatori sanitari basato su piattaforma resa disponibile dall'ISS.

Sviluppo di strumenti indossabili innovativi per il monitoraggio termografico

Recentemente il grande sviluppo dell'*Information Technology* (IT) coniugato alla miniaturizzazione dei sensori ha permesso la realizzazione di sistemi indossabili (*wearable*) sempre più efficienti nel monitoraggio di parametri fisiologici. La linea di ricerca presentata si prefigge lo studio, la realizzazione e la validazione di strumenti indossabili per il monitoraggio termografico. Un tale strumento potrebbe trovare applicazione nelle aree dove la termografia ha ottenuto risultati più significativi quali la neurologia, i disordini vascolari, la flogosi, i disordini reumatici, la circolazione sanguigna, l'oncologia (specialmente il tumore alla mammella). I sistemi più comunemente usati in termografia sono basati su tecniche all'infrarosso o su tecnologie a cristalli liquidi allosterici. Le tecnologie ad infrarosso non sono utilizzabili per il monitoraggio indossabile a causa del loro ingombro (Telecamere); i cristalli liquidi permettono la discriminazione di pochi valori di temperatura in accordo a prefissate soglie e non permettono la registrazione del *pattern* termografico. Le tecnologie attuabili per il monitoraggio termografico sono quelle basate su sensori a contatto. La linea di ricerca prende le mosse da uno studio preliminare di fattibilità.

Risultati attesi nel triennio

La termografia della pelle (*skin contact thermography*) è uno strumento dotato di grandissime potenzialità; infatti la temperatura della pelle è influenzata da fenomeni fisiologici degli strati sottostanti, e dalla istologia. L'*imaging* termografico permette pertanto un'indagine del corpo umano alternativo ai metodi tradizionali. La realizzazione di tali strumenti in modo indossabile potrà permettere l'estensione della misura termografica alle 24 ore fornendo rilevanti informazioni di cronobiologia. Misure termografiche condotte a comprendere i ritmi circadiani possono permettere ad esempio la rivelazione di neoplasie alla mammella. Risultati rilevanti sono attesi anche per quanto riguarda l'analisi dei problemi circolatori; un tale strumento ad esempio può permettere il monitoraggio di aree del corpo umano durante test consolidati che si basano sull'esecuzione dell'esercizio fisico tramite cicloergometro. Un altro settore dove tale strumento ha prospettive è quello del monitoraggio delle flogosi. Sia in queste come in altre applicazioni cliniche la conoscenza medica potrebbe essere ampliata grazie a *data-mining* mirati sui *pattern*-termografici

Trasferibilità dei risultati

Gli strumenti indossabili basati sulla termografia a contatto potranno permettere un triplo vantaggio nell'uso clinico:

(Costi) Uno strumento indossabile per termografia a contatto si basa su sensori commerciali economici e può essere realizzato con un costo di alcune centinaia di euro, sensibilmente minore al costo di un sistema ad infrarossi che è di diverse migliaia di euro.

(Indagine clinica) L'indagine clinica può essere spostata a casa del paziente che utilizzerà tali strumenti per monitoraggio in applicazioni di cronobiologia.

(Integrazione con altri strumenti) Inoltre tali strumenti potranno essere utilizzati in piccoli studi medici anche in modo integrato con altri strumenti quali il cicloergometro, l'ECG lo sfigmomanometro in applicazioni consolidate in letteratura per lo studio della circolazione sanguigna di aree del corpo durante l'esercizio fisico.

(Utilizzazione su larga scala) L'utilizzabilità su larga scala è già stata dimostrata praticabile in studi di fattibilità. In primo luogo tale strumento può essere realizzato in accordo alle normative CE sui dispositivi medici, anche per quanto riguarda il materiale utilizzato all'interfaccia con la pelle. In secondo luogo la *sensing head* è stata sviluppata senza utilizzare dispositivi cancellabili con gli ultravioletti; è quindi possibile una sterilizzazione interpaciente sia basata su UV, sia su processi termici, o tramite fluidi.

Metodi di trasduzione sensoriale dell' informazione

Le soluzioni bioingegneristiche per la trasduzione sensoriale presuppongono la progettazione di due unità. La prima è un'unità di rilevazione dell'informazione (anche da parametri fisiologici) la seconda è un'unità di restituzione dell'informazione opportunamente codificata tramite attuatori.

Questa linea si prefigge lo scopo di testare soluzioni bioingegneristiche di trasduzione sensoriale in due settori rilevanti per il loro impatto sul servizio sanitario nazionale.

1) Il primo è quello relativo a soggetti con *handicap* visivo e/o uditivo, verranno pertanto realizzate opportune unità di comunicazione dedicate a questo scopo.

2) Il secondo consiste nella realizzazione di strumenti per il monitoraggio di parametri fisiologici del guidatore di auto con lo scopo di generare allarmi in relazione a soglie che indicano il sonno.

Risultati attesi nel triennio

1) Un guanto sensorizzato permetterà la trasduzione della gestualità in un formato elettronico dell'informazione importabile da pc. Si prevede di realizzare sistemi basati su attuatori vibrotattili per la restituzione dell'informazione opportunamente codificata ai sordociechi a partire da un formato elettronico

2) Strumenti indossabili dedicati a guidatori potranno permettere di monitorare alcuni parametri fisiologici rilevanti, quali la temperatura, l'inclinazione del collo, del tronco, i segnali neuronali, la pressione arteriosa e la pressione dei polpastrelli sul volante. Tali parametri potranno essere utilizzati per determinare la soglia del sonno e per attivare un sistema di *biofeedback* vibrotattile o sonoro.

Trasferibilità dei risultati

1) Tali strumenti hanno un costo bassissimo, sono facili da realizzare anche in modo miniaturizzato. Strumenti in grado di facilitare la comunicazione a soggetti con *handicap* sensoriale visivo e/o uditivo potrebbero dare un contributo al superamento di barriere di comunicazione che costringono spesso il soggetto con *handicap* all'isolamento.

2) Tali strumenti hanno un costo bassissimo, sono facili da realizzare anche in modo miniaturizzato; potranno inoltre essere messi a disposizione a U.O che storicamente in ISS affrontano gli studi di infortunistica stradale anche in relazione ai costi del sistema sanitario nazionale

Sviluppo di strumenti indossabili innovativi per il monitoraggio di parametri fisiologici cinematici del movimento umano

Recentemente il grande sviluppo dell'*Information Technology* (IT) coniugato alla miniaturizzazione dei sensori ha permesso la realizzazione di sistemi indossabili (*wearable*) per il monitoraggio di parametri fisiologici sempre più efficienti. La linea di ricerca ha come obiettivo la costruzione e la validazione di strumenti indossabili innovativi basati su sensori accelerometrici e di velocità angolare. Tali sensori saranno utilizzati inoltre per il monitoraggio di parametri fisiologici cinematici in applicazioni mediche. Tali strumenti presentano innanzitutto un'alternativa ai costosi sistemi di rilevamento optoelettronici o ultrasonici. Questi sensori sono leggeri e possono essere posizionati con relativa facilità nei segmenti corporei di interesse per l'analisi del movimento in clinica.

Risultati attesi nel triennio

Studi preliminari hanno dimostrato la fattibilità dell'uso di tali strumenti per la ricostruzione della traiettoria negli intervalli di breve durata. In particolare potranno essere utilizzati sia nei

test per la valutazione dell'abilità e della disabilità (basati su atti locomotori transitori quali *sit-to-stand*, *gait initiation*, *standing a step*) sia nei *test* posturografici.

I principali risultati sono attesi sia in posturografia, sia nell'ambito della valutazione dell'abilità motoria dove potranno fornire importante informazione quantitativa al medico. Inoltre tali strumenti potranno essere utilizzati in applicazioni di *biofeedback* [6] su soggetti con *deficit* motorio, quali i pazienti vestibolari o colpiti da *ictus* o con patologie quali l'Alzheimer e il Parkinson.

Trasferibilità dei risultati

I sensori cinematici possono presentare rilevanti vantaggi per quanto riguarda la trasferibilità in piccoli studi medici di analisi del movimento.

(Costi) Infatti questi possono rappresentare un'alternativa a bassissimo costo ai più complessi metodi optoelettronici. Uno strumento optoelettronico presenta attualmente un costo pari ai 250Keuro e necessità di grandi volumi; uno strumento basato su sensori accelerometrici e di velocità angolare presenta un costo di poche migliaia di euro. Pure Unità operative mediche dotate di uno scarso *budget* possono pertanto dotarsi di tali strumenti per l'analisi del movimento a basso costo.

(Facilità della somministrazione clinica). Uno strumento indossabile per il monitoraggio cinematico presenta il vantaggio di non ostacolare il paziente durante la misura clinica; uno strumento optoelettronico al contrario necessita il posizionamento di diversi *marker*, di numerose telecamere che ostacolano e limitano il movimento del soggetto.

(Adatto all'investigazione di diverse patologie). Nell'uso della valutazione dell'abilità e della disabilità in associazione di *task* locomotori transitori (quali il *sit-to-stand*) i sensori cinematici si presentano come una valida alternativa a metodi più complessi per l'investigazione della conoscenza medica su diverse patologie.

Livelli di silice aerodispersa in un ambiente urbano

Le particelle di silice rappresentano una componente costante della frazione inalabile (PM10) del particolato aerodisperso. Il rischio correlato all'inalazione della silice è ancora considerato limitato all'esposizione professionale, in cui si verifica l'inalazione di *freshly fractured silica* considerevolmente citotossica per la presenza di radicali altamente reattivi sulla superficie delle particelle. Risultati ottenuti negli ultimi anni in studi di tossicologia, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno evidenziato che anche la *aged fractured silica*, quella cioè che può essere presente nel particolato inalabile ambientale, mostra una rilevante azione infiammatoria a livello dell'apparato respiratorio. In uno studio sul ruolo della silice nelle proprietà tossicologiche del PM10, è stata valutata la risposta di macrofagi alveolari, in termini di attività fagocitica e di rilascio di mediatori dell'infiammazione, una volta esposti a dosi non citotossiche di particelle di silice invecchiate e preparate in maniera tale da riprodurre le caratteristiche delle particelle di silice aerodisperse. I risultati hanno evidenziato che l'interazione delle particelle di silice con i macrofagi può comportare una diminuzione dei meccanismi di difesa e la formazione di prodotti di perossidazione lipidica. L'obiettivo di questo lavoro sarà quello di studiare l'andamento stagionale della concentrazione di particelle di silice nella frazione inalabile (PM10) del particolato aerodisperso in un'area urbana.

Risultati attesi nel triennio

In letteratura sono rintracciabili pochi dati sulla concentrazione di silice aerodispersa in ambienti urbani. Davis et al (1984) in uno studio condotto in 22 città U.S. hanno trovato concentrazioni di quarzo aerodisperso comprese tra 0,9 e 8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mentre Puledda et al. in uno studio in un'area urbana di Roma, una concentrazione compresa tra 0,6-1,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, circa 100 volte inferiore al TLV (threshold limit value) fissato dalla ACGIH (*American Conference of*

Governmental Industrial Hygienists) per gli ambienti di lavoro. Alla luce delle evidenze riportate sopra, risulta importante conoscere le concentrazioni di quarzo presenti in un ambiente urbano al fine di valutare l'esposizione della popolazione a tale inquinante. La frazione PM10, prelevata mediante un impattore a cascata, sarà caratterizzata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a raggi X per l'analisi qualitativa. Parallelamente si porterà avanti lo studio della concentrazione ponderale di quarzo nel particolato effettuando le misure mediante diffrattometria a raggi X (DRX) con riferimento al metodo NIOSH 7500.

Trasferibilità dei risultati

Nonostante la concentrazione di quarzo aerodisperso in ambiente urbano sia bassa, le particelle di silice si ritrovano costantemente nel parenchima polmonare e nel BALF di soggetti non professionalmente esposti, rappresentando una delle tipologie di particolato che presentano maggior biopersistenza nell'apparato respiratorio. Si pone il problema di stabilire criteri per valutare i dati che saranno rilevati dal punto di vista della sanità pubblica. Ad oggi non sono stati dettati *standard* di riferimento per la silice cristallina in ambiente di vita. Come presumibile le concentrazioni presenti nell'aria urbana sono molto più basse dei limiti stabiliti per l'esposizione professionale a questo agente di rischio (TLV-TWA del quarzo 50 µg/m³, ACGIH 2004). Tuttavia si deve osservare che la dose giornaliera di silice che potrebbe essere inalata da un soggetto esposto a queste situazioni ambientali (da 10 a 30 µg a fronte di una popolazione di macrofagi alveolari stimabile mediamente in circa 20x10⁶ cellule) risulta confrontabile con quella utilizzata nei citati lavori di tossicologia *in vitro* e che ha dimostrato di essere in grado di determinare una rilevante azione infiammatoria nei *test* sulle colture macrofagiche.

Messa a punto di un sistema per la simulazione del ciclo masticatorio

In questo studio si vogliono valutare i parametri di resistenza a fatica e la *compliance* sia dei materiali usati in implantologia sia del sistema *fixture-abutment*, attraverso lo sviluppo di una procedura adeguata a simulare il processo di masticazione.

La prima fase della sperimentazione prevede la definizione di una procedura di prova volta a simulare l'attività masticatoria di 5 o 10 anni, attraverso l'analisi della fisiologia della masticazione di un individuo sano, si definiranno i parametri che la caratterizzano (frequenza, forza, angolo di rotazione del dente, angolo di inclinazione della radice, ecc.).

Successivamente, ogni *fixture* sarà posta in asse in blocchetti di cemento osseo a base di PMMA e sarà connessa alla relativa sovrastruttura protesica (*abutment*).

Per tutti i sistemi *fixture-abutment* sarà eseguita la ricostruzione della corona, secondo una procedura applicata normalmente in clinica impiantiva.

Ogni campione (*fixture-abutment-corona*) sarà immobilizzato, per mezzo di afferraggi appositamente realizzati, inclinato di 15° rispetto all'asse verticale. Sarà, poi, realizzata la corona che, per mezzo di afferraggi, sarà posizionata a contatto con il campione, in modo da simulare l'azione del dente superiore, su quello ricostruito, durante l'atto masticatorio.

Tutti i campioni saranno sottoposti a 2 o 5 milioni di cicli per mezzo di una strumentazione servoidraulica, Minibionix 858 (MTS Instr, USA) dotata di una cella di carico assiale e torsionale di 2,5 KN. Ogni campione sarà sollecitato da un carico assiale sinusoidale, variabile tra i 50N e i 500N, con una frequenza di 2Hz e sarà soggetto a una torsione massimale di 0.5°. Le prove saranno eseguite a secco a temperatura ambiente (25°C e 50% di umidità).

Al termine delle prove dinamiche, per tutti i campioni sarà eseguita con una micro-TAC (*Sky-scan 1072*), l'analisi della resina utilizzata per realizzare le corone, al fine di individuarne le caratteristiche di resistenza a fatica e di usura superficiale, e successivamente, si effettuerà un'analisi dell'interfaccia *fixture-abutment*, al fine di evidenziare eventuali cedimenti della

connessione e la presenza di usura. Successivamente saranno eseguite osservazioni comparative al SEM.

Risultati attesi nel triennio

Per svolgere la sperimentazione sui materiali, sui dispositivi e sugli impianti progettati per essere inseriti nel cavo orale è necessario avere un sistema di simulazione *in vitro* del ciclo masticatorio.

Una volta messo a punto il protocollo di prova per l'applicazione corretta delle forze e il sistema di sostegno adeguato per i campioni durante le prove è possibile valutare l'affidabilità a lungo termine dei materiali e degli accoppiamenti delle parti interessate in termini di stabilità e di usura delle connessioni, principali cause del fallimento a lungo termine della terapia implantare.

Alla valutazione quali-quantitativa dei risultati ottenuti con le prove meccaniche a fatica, seguiranno, un'analisi microtomografica 3D e un'analisi comparativa ultrastrutturale eseguita al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) dell'interfaccia *fixture-abutment*, al fine di individuare sia eventuali alterazioni della struttura (cricche, microfratture) sia la presenza di usura tra i due componenti della protesi.

La simulazione del ciclo masticatorio, sogno di molti ricercatori in questo campo, permetterà di fornire un valido banco di prova per tutti i materiali e i dispositivi utilizzati in Implantologia e in tutte le altre aree che interessano i problemi del cavo orale. Sicuramente tale simulazione che viene sviluppata in aria avrà bisogno di un successivo studio che permetterà la possibilità di essere eseguita in un ambiente con saliva artificiale.

La nuova valutazione microtomografica tridimensionale ci permetterà di indagare il campione non solo su superfici bidimensionali selezionate solamente in base all'esperienza, come era possibile finora con le tecniche tradizionali, ma potremo osservare lungo tutti i 360° dell'oggetto acquisito e ricostruito ottenendo anche visualizzazioni di tipo quantitativo (variazioni volumetriche, variazioni densitometriche, ecc.).

Trasferibilità dei risultati

L'edentulismo rappresenta un problema sociale di estrema importanza; il *National Institute of Health* ha rilevato come il 42% della popolazione americana di età superiore ai 65 anni e il 4% della popolazione di età compresa tra i 35 e i 64 anni, mostra una parziale o completa edentulia e, conseguentemente, necessita del ripristino della funzionalità masticatoria, attraverso la protesizzazione fissa o rimovibile. La situazione europea è molto simile a quella americana mentre la situazione dei popoli orientali emergenti è catastrofica.

Inoltre, l'allungamento della vita media della popolazione, ha portato le case produttrici di elementi implantari a concentrare le proprie ricerche su varianti strutturali tese a migliorare le caratteristiche di funzionalità e la durata nel tempo dei materiali e degli impianti stessi.

Mettere a punto un sistema per simulare l'attività masticatoria ha un'importanza estrema per approfondire la conoscenza dell'ambiente orale e aiutare le ricerche tese a progettare nuovi materiali e nuovi dispositivi, nonché nuove tecniche implantologiche. La simulazione *in vitro*, prima della sperimentazione clinica potrà assicurare un miglior intervento sui pazienti al fine di una riabilitazione orale funzionale e quindi risolvere nel modo meno traumatico i problemi che affliggono buona parte della popolazione di questa terra.

Metodi di oftalmologia digitale

Lo scopo di questa linea di ricerca è quello di fornire un utile supporto alla oftalmologia, sanando le limitazioni preceentemente illustrate, mediante l'applicazione di tecniche di digitalizzazione e di elaborazione numerica delle immagini ad apparati di uso comune nella

diagnosi di alcune patologie dell'occhio; in questo modo lo specialista potrà disporre di strumentazione non invasiva, economica e versatile.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione di strumenti per la valutazione obbiettiva e precoce di patologie del fondo oculare

Metodi fisici per l'identificazione di alimenti irradiati

Il DL.vo 30/01/01 n. 94, che recepisce le Direttive Comunitarie 1999/2/CE e 1999/3/CE relative agli alimenti irradiati, sancisce all'art. 17 la necessità di effettuare controlli ufficiali sugli alimenti trattati sia in fase di irraggiamento che di commercializzazione. Per quanto riguarda i controlli in fase di commercializzazione, all'ISS è demandato il compito di individuare i metodi di identificazione degli alimenti irradiati e di effettuare le analisi di revisione. Negli ultimi anni nel Reparto di Dosimetria delle Radiazioni sono stati messi a punto i metodi di identificazione basati sulle tecniche della risonanza di *spin* elettronico (ESR), della termoluminescenza (TL) e della luminescenza otticamente stimolata (OSL). Attualmente partecipiamo a un *Proficiency Test* a livello internazionale, relativo alle tecniche di identificazione messe a punto. In collaborazione con il CNQARA, è stata avviata un'indagine conoscitiva su erbe e spezie all'importazione. Tale indagine, condotta con le tecniche TL e OSL, è volta ad accertare l'eventuale presenza di alimenti trattati ma non etichettati. In collaborazione con altri enti nazionali, sta per essere avviata un'attività che ha come obiettivo lo sviluppo e la validazione di metodologie innovative basate sulle tecniche ESR e TL per l'identificazione di alimenti irradiati di origine animale.

Risultati attesi nel triennio

Considerato il ruolo dell'ISS di consulenza allo Stato e alle Regioni per gli aspetti riguardanti i metodi di identificazione degli alimenti irradiati, l'obiettivo principale che si intende raggiungere è la verifica sperimentale dell'affidabilità degli *standard* CEN basati sulle tecniche di tipo fisico attraverso l'analisi dettagliata delle varie fasi previste nelle procedure operative. In particolare si intende valutare la percentuale di identificazioni non corrette ottenibili con la tecnica OSL in relazione alle condizioni di misura (*cross-contamination*) e conservazione (*fading* ottico). In considerazione della maggiore versatilità e semplicità d'uso della tecnica EPR rispetto alla TL e OSL, il secondo obiettivo è relativo 1) alla estensione del protocollo CEN1786, che è stato validato solo per manzo, pollo e trote, ad altre matrici alimentari di origine animale, 2) all'integrazione del protocollo CEN1787 per l'utilizzo della tecnica EPR anche su alimenti in cui il segnale EPR della cellulosa non sia rivelabile. Infine, nell'ambito di indagini nazionali, si otterranno informazioni, ad oggi non disponibili, sulla presenza sul mercato italiano di prodotti alimentari irradiati ma non correttamente etichettati.

Trasferibilità dei risultati

Le procedure operative che verranno messe a punto e validate nell'ambito dell'attività prevista, entreranno a far parte delle metodiche ufficiali utilizzabili sul territorio nazionale da parte degli organismi preposti al controllo ufficiale degli alimenti. Il trasferimento delle metodiche agli operatori preposti avverrà attraverso diversi canali: pubblicazione di rapporti tecnici, articoli scientifici, corsi di formazione, *workshop*.

MISCCSC Metodi innovativi a supporto della colonizzazione cellulare di dispositivi medici per il sistema cardiovascolare

I sostituti protesici in ambito cardiovascolare, valvole cardiache meccaniche o di origine animale e *graft* vascolari, pur avendo dimostrato la propria validità presentano limiti intrinseci

che ne condizionano l'impiego. L'ingegneria dei tessuti rappresenta un emergente campo di studio che permette la produzione di dispositivi protesici con caratteristiche di gran lunga preferibili alle comuni protesi attualmente disponibili.

Si propongono quindi metodi finalizzati per tale ricerca, che possano fornire sistemi avanzati di valutazione della risposta cellulare a determinate condizioni sperimentali e tecnologie per la produzione di supporti per colture cellulari da impiegare come sostituti protesici.

I passi da compiere sono i seguenti:

Messa a punto di *set-up* sperimentale per la produzione di *scaffold* polimerici mediante *elettrospinning*: risulta necessaria l'unione delle competenze dell'ISS e del Dipartimento di Scienza e Tecnologie Chimiche dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", grazie ad una collaborazione già avviata.

Studi di impedenziometria cellulare mediante sistemi sperimentali dedicati: è possibile valutare in tempo reale la risposta di diverse linee cellulari sia in condizioni *standard* di coltura sia in condizioni rispondenti a determinati protocolli sperimentali.

Sviluppo di camere di flusso innovative per valutare la risposta cellulare a specifiche condizioni meccaniche di *shear stress*, necessario per studiare come specifici *pattern* fluidodinamici influenzino l'attività cellulare sia morfologicamente sia bio-chimicamente.

Sviluppo di bioreattori per simulare condizioni sperimentali prossime a quelle fisiologiche con cui condizionare e valutare i costrutti ingegnerizzati.

Risultati attesi nel triennio

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 quindi ottimizzare, le condizioni di crescita cellulare in condizioni statiche e per studiare possibili effetti citotossici a carico delle linee cellulari selezionate, dovuti ad esempio all'interazione con particolari substrati.

Poiché per ottenere dati sperimentali in condizioni fisiologiche è fondamentale simulare le caratteristiche fluidodinamiche del torrente ematico, le camere di flusso permetteranno di analizzare le modificazioni cellulari a stimoli meccanici che si evidenziano in un sostanziale arrangiamento spaziale nella direzione del flusso e produzione di fattori bio-chimici specifici. A questo punto l'impiego di bioreattori permetterà di valutare la risposta cellulare su costrutti tridimensionali macroscopici come vasi e valvole cardiache.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di strumentazione innovativa in ISS per poter portare avanti studi di ingegneria dei tessuti, campo di ricerca all'avanguardia come dimostrano i numerosi lavori scientifici reperibili in letteratura di settore.

Sviluppo e commercializzazione del brevetto "Camera di flusso per colture cellulari in condizioni dinamiche a gradiente variabile di *shear stress* mediante il progetto di geometrie specifiche"

Modelli dell'induzione di danno molecolare e cellulare da parte di particelle cariche

Le radiazioni ionizzanti, quali raggi gamma e particelle cariche, danno luogo, nell'attraversamento delle cellule, a una successione di eventi, che parte dalle deposizioni iniziali di energia, prosegue con la produzione di lesioni molecolari (quali danni al DNA) e al loro processamento, e infine porta alla produzione di diversi effetti biologici, quali ad esempio la morte cellulare. I meccanismi che governano questa serie di eventi non sono noti nei dettagli.

Inoltre sono emerse recentemente diverse evidenze sperimentali che mostrano come effetti cellulari hanno luogo anche in cellule non direttamente attraversate dalla radiazione, ma contigue a cellule attraversate.

In questa attività ci si propone di affrontare una parte di questi fenomeni; ciò per mezzo di modelli biofisici atti a descrivere alcune caratteristiche relative al danno radioindotto al DNA e alcuni aspetti della comunicazione intercellulare responsabile della manifestazione di effetti cellulari in cellule non irraggiate. Riguardo il danno al DNA, l'attenzione si concentrerà sulle proprietà statistiche delle doppie rotture del DNA (causa dell'interruzione della doppia elica), in particolare sulla loro correlazione spaziale. La comunicazione intercellulare sarà studiata simulando il rilascio e la diffusione, nel mezzo intercellulare, di molecole-segnale. La ricerca sarà effettuata in collaborazione con il reparto di biofisica delle radiazioni ionizzanti e fisica biomedica e con l'Università di Pavia.

Risultati attesi nel triennio

Le proprietà statistiche della distribuzione spaziale delle doppie rotture del DNA dipendono dal tipo di radiazione incidente. Nell'ambito della collaborazione, un codice Monte Carlo a disposizione dell'Università di Pavia sarà utilizzato per caratterizzare le diverse distribuzioni di doppie rotture a seguito di irraggiamento cellulare con fasci monocromatici di radiazione. Questi risultati saranno il punto di partenza per un modello biofisico per la descrizione delle distribuzioni di doppie rotture causate dall'irraggiamento con fasci di particelle cariche con energia variabile. Ove possibile, i risultati saranno confrontati con dati sperimentali riguardanti lo spettro di frammentazione del DNA a seguito di irraggiamento.

Lo studio della comunicazione intercellulare prenderà in considerazione alcune ipotesi plausibili sull'interazione tra le molecole-segnale, emesse dalle molecole irraggiate, e le cellule non irraggiate raggiunte da esse. Per mezzo di simulazioni si studierà la distribuzione spaziale e temporale delle cellule non irraggiate che presentano effetti cellulari, e la variazione di questa distribuzione con la variazione delle ipotesi sull'interazione con le molecole-segnale. Ove possibile, i risultati saranno confrontati con dati sperimentali sulla comunicazione tra cellule irraggiate e cellule non irraggiate, prodotte in attività collegate a questa, in programma in questo Dipartimento.

Trasferibilità dei risultati

I risultati potranno essere utilizzati per costruire modelli di induzione di effetti cellulari a seguito di irraggiamento con fasci modulati. Questo tipo di informazione è rilevante nella pratica adroterapica.

Modulazione della polifarmacoresistenza delle cellule tumorali mediante l'impiego di nuove sostanze ad attività chemiosensibilizzante

Uno degli obiettivi della terapia oncologica è la ricerca di nuovi composti efficaci nel trattamento di tumori farmacoresistenti che presentino effetti collaterali limitati. Numerose sostanze di sintesi e naturali vengono confrontate con lo scopo di rendere sensibile il fenotipo resistente di cellule tumorali in coltura.

Sulla base dei risultati ottenuti negli anni preceenti, ci si propone di continuare gli studi su due modelli sperimentali: a) l'impiego di alcaloidi vegetali, quale la voacamina, da noi precedentemente utilizzata per il suo effetto chemiosensibilizzante nei confronti di linee cellulari tumorali umane resistenti al trattamento chemioterapico, b) l'utilizzo di agenti di sintesi, quali nitrossidi, porfirine e clorine, in grado di aumentare la citotossicità di composti chimici utilizzati nella terapia farmacologica di tumori resistenti. Per quanto riguarda lo studio dei meccanismi che regolano la diversa risposta delle cellule al trattamento con la voacamina, abbiamo dimostrato che questo alcaloide estratto dalla pianta infestante *Peschiera fuchsiaeifolia*

è in grado di aumentare l'effetto citotossico della doxorubicina su cellule resistenti di osteosarcoma umano esercitando un'azione competitiva nei confronti della P-glicoproteina, nota proteina coinvolta nel trasporto extracellulare di agenti citotossici. Secondo obiettivo è quello di studiare sostanze quali nitrossidi (TEMPOL) e composti utilizzati nella terapia fotodinamica in grado di indurre *stress* ossidativo, aumentando la produzione di specie reattive dell'ossigeno e i livelli intracitoplasmatici di proteine quali p21 e Bax, diminuendo l'espressione di Bcl-2, favorendo così la morte cellulare in tumori farmacoresistenti.

Risultati attesi nel triennio

Nella prima parte del progetto si studierà l'effetto chemiosensibilizzante della voacamina in tumori altamente aggressivi di diversa origine istologica. In particolare si analizzerà il ruolo della tubulina e del sistema proteico correlato alla regolazione del ciclo cellulare, dopo trattamento singolo o in associazione con chemioterapici. Verrà studiata la distribuzione e l'espressione di proteine regolatorie della fase del ciclo G2/M come ciclina B1, chinasi (Cdc2) e fosfatasi (Cdc25). Inoltre si valuterà il tipo di morte cellulare indotto dalla voacamina in tumori farmacoresistenti, apoptosi o autofagia, e i *marker* ad essa correlati. L'autofagia è un processo che coinvolge la degradazione e l'eventuale riutilizzazione di proteine e di componenti intracellulari in risposta allo *stress* di diversa origine. Può essere un fenomeno protettivo nei confronti dei trattamenti antitumorali bloccando la via apoptotica o un fenomeno distruttivo indotto dalla terapia. A tale proposito si studierà mediante composti inibitori delle chinasi (PI3K), quale la 3-metiladenina (3-MA), la formazione di strutture preautofagosomiali e mediante composti inibitori dell'attività ATPasica (bafilomicina A1) il blocco nella fusione tra autofagosoma e lisosoma. Nella seconda parte si studierà il ruolo delle molecole correlate alla produzione di specie radicaliche coinvolte nel programma apoptotico dopo l'utilizzo di nuovi derivati che dimostrano citotossicità nei confronti di cellule tumorali di adenocarcinoma mammario umano.

Trasferibilità dei risultati

La prima fase sperimentale, per valutare l'effetto chemiosensibilizzante della voacamina in vivo, prevede lo studio della farmacodinamica e la distribuzione nei tessuti in modo da scegliere la dose ottimale e la modalità di somministrazione più idonea. Questo lavoro permetterà di verificare negli animali, in cui sono state impiantate cellule tumorali farmacoresistenti e hanno quindi sviluppato il tumore, l'efficacia dell'estratto vegetale e la sua capacità di aumentare l'effetto antitumorale della doxorubicina o di altri chemioterapici. Nella seconda parte sperimentale, diversi fotocomposti utilizzati nella terapia fotodinamica di tumori solidi verranno combinati con sostanze naturali con l'obiettivo di verificarne l'effetto sensibilizzante nei confronti di tumori resistenti.

Neuroscienza computazionale e dispositivi elettronici neuromorfi

Il progetto ha una componente teorica e due filoni di realizzazione elettronica.

In ambito teorico continueremo lo studio dell'attività collettiva di popolazioni neuronali mediante la teoria dei processi stocastici, e in particolare il passaggio a modelli molto più realistici mediante una riduzione efficace della dimensionalità del problema. Studieremo inoltre la dinamica sottesa ai fenomeni di multi-stabilità percettiva.

La componente elettronica si articolerà su due linee. 1) realizzazione elettronica di dispositivi neuromorfo: progetto, descrizione teorica e costruzione di un sistema di *chip* neuronali con apprendimento automatico che utilizzi meccanismi di rinforzo dipendenti dal contesto. Questa linea è l'estensione di un progetto europeo appena concluso, che verrà probabilmente rilanciato nel 2006-2008.

Progettazione e costruzione di dispositivi di ausilio percettivo per non vedenti. Attualmente questo lavoro viene finanziato dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, ed è svolto in collaborazione con il Politecnico di Torino. Partendo dal prototipo recentemente costruito per la trasduzione in tempo reale di informazioni visive in stimoli tattili dinamici, si svilupperanno *test* psicofisici e corrispondenti perfezionamenti del dispositivo.

Risultati attesi nel triennio

In ambito teorico, ci attendiamo di raccordare quantitativamente la descrizione dinamica di popolazioni neuronali con le rilevanti quantità sperimentalmente accessibili

Lo sviluppo di sistemi neuromorfi con meccanismi di apprendimento dipendenti dal contesto costituirà un passo essenziale verso l'applicabilità di tali sistemi a situazioni realistiche.

Nello sviluppo di ausili percettivi per il non vedente ci aspettiamo di raggiungere un'effettiva usabilità per l'utente, sia in termini di valore aggiunto percettivo che di ergonomia.

Trasferibilità dei risultati

Dispositivi di ausilio percettivo per il non vedente

Politiche di protezione dalle radiazioni non ionizzanti

L'Istituto Superiore di Sanità 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 dell'OMS, sia con la presenza nel Comitato Consultivo Internazionale, sia con il ruolo di esperto di riferimento per l'Italia. L'Istituto partecipa inoltre all'azione Europea COST 281 "Potenziali implicazioni sanitarie dei sistemi di comunicazione mobile", all'azione coordinata della Commissione Europea EMF-NET "Effetti dell'esposizione a campi elettromagnetici: dalla scienza alla salute e alla sicurezza sul lavoro" e al progetto europeo EIS-EMF "Sistema informativo europeo – Campi elettromagnetici", non solo con il contributo alle relative attività ma anche con la presenza in tutti i relativi comitati scientifici o di gestione. Infine, il responsabile della ricerca è attualmente il Presidente della Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non Ionizzanti (ICNIRP). 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, avviato a partire dall'inizio del 2006.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito del Progetto internazionale CEM si prevee la valutazione globale dei rischi sanitari connessi a diversi tipi e sorgenti di campi elettromagnetici, sotto forma di rapporti della serie "*Environmental Health Criteria*". L'Azione COST 281 organizzerà almeno 2 seminari nel corso del 2006 per concludersi nello stesso anno con un rapporto finale. L'azione coordinata EMF-NET si svilupperà fino al 2008 con la produzione di numerosi documenti di analisi e interpretazione dei risultati della ricerca nel settore. Nell'ambito del progetto EIS-EMF è prevista la realizzazione di una banca dati europea dei dati scientifici pertinenti. La Commissione ICNIRP, oltre a fornire consulenza ai governi e alle autorità sanitarie dei diversi paesi, aggiornerà le proprie linee guida di esposizione. In ambito italiano, si prevede (e si auspica) un profondo coinvolgimento dell'ISS nelle attività necessarie al recepimento della direttiva europea per la protezione dei lavoratori dai campi elettromagnetici, che dovrà avvenire entro l'aprile 2008. Si prevede anche un contributo significativo al dibattito sulla giustificazione e l'efficacia di eventuali misure cautelative, coerentemente con gli indirizzi che l'OMS sta attualmente elaborando.

Previsione e controllo retroazionato della crisi epilettica

Collaborazione con il NEUROMED (IRCCS, IS) e l'Università "La Sapienza" di Roma, si articola su tre direttrici:

1. Analisi e interpretazione dell'attività nervosa registrata secondo procedure *standard* di indagine pre-chirurgica da pazienti con epilessia parziale farmaco-resistente. I dati acquisiti in modalità diverse (Video-EEG, griglie subdurali, elettrodi di profondità) nel contesto di compiti specifici svolti dai pazienti, descrivono l'attività nervosa su scale spaziali diverse. Questo offre l'opportunità di caratterizzare il correlato nervoso dei comportamenti esibiti, e la scala caratteristica delle popolazioni neuronali coinvolte, vincolando con ciò i modelli teorici.

2. Sviluppo di strumenti predittivi della crisi epilettica. Inizialmente si trasferiranno in ambito clinico delle tecniche consolidate nell'analisi del segnale EEG, adattandole al segnale da griglia subdurale o da elettrodo di profondità. Esploreremo poi l'applicabilità di tecniche molto recentemente introdotte di classificazione dei segnali e predizione di serie temporali mediante reti neurali adattive supervisionate.

3. Studio di fattibilità per un sistema autonomo di anticipazione e controllo della crisi epilettica, ispirato alle esperienze recenti di stimolazione elettrica profonda in pazienti epilettici, e basato sulla possibilità che un algoritmo di previsione a breve termine della crisi possa attivare una stimolazione elettrica in grado di controllarne o prevenirne l'insorgenza.

Risultati attesi nel triennio

Trasferimento in ambito clinico di tecniche di analisi e predizione del segnale in grado di migliorare la qualità dell'indagine pre-chirurgica.

Caratterizzazione dei *pattern* spazio-temporali di attività nervosa associati all'insorgenza della crisi epilettica.

Valutazione di fattibilità di un sistema controreazionato di stimolazione elettrica (sia da elettrodo di profondità che da griglia sub-durale) per la prevenzione o controllo dell'insorgenza della crisi epilettica.

Trasferibilità dei risultati

Integrazione di sistemi di analisi del segnale nervoso di uso clinico. Ingegnerizzazione di microelettrodi per analisi multi-scala del segnale nervoso.

Radioattività artificiale e naturale modificata da attività umane

Sin dal 1986, a seguito del *fallout* conseguente all'incidente alla centrale nucleare di Chernobyl, il reparto Radioattività e suoi effetti sulla salute ha sviluppato un'attività di ricerca sulle conseguenze della presenza di radioattività nell'ambiente per embrione, feto e bambino allattato al seno. Questa attività ha sempre avuto un suo aspetto sperimentale e uno più strettamente radioprotezionistico e di calcolo. La sua parte sperimentale, dal 1989 in collaborazione con l'allora Laboratorio di Igiene Ambientale (oggi Dipartimento Ambiente), ha riguardato la misura di radionuclidi nel latte materno, mentre la sua parte radioprotezionistica e di calcolo ha riguardato finora principalmente la valutazione delle dosi all'embrione e feto e al lattante da esposizioni della madre a radionuclidi di origine e artificiale o naturale modificata da attività umane (*Naturally Occurring Radioactive Material* e uranio impoverito) presenti nell'ambiente.

Negli ultimi anni è andata emergendo l'importanza di esposizioni sia dei lavoratori che della popolazione a NORM, materiali di origine naturale che, per le lavorazioni che subiscono, concentrano il loro contenuto di radionuclidi naturali. Un esempio tipico è la presenza sul territorio di discariche di fosfogessi legato a estrazione di acido fosforico da fosforiti. Lo studio di queste possibili esposizioni richiede la comprensione dei fenomeni in gioco, la messa a punto di nuove tecniche di misura e di campionamento e stime di dose.

Risultati attesi nel triennio

Per quanto riguarda la misura di radionuclidi nel latte materno si prevede la realizzazione di un sistema rapido per la misura dello ^{90}Sr nel latte, utilizzando la cromatografia ionica. Una volta realizzato il sistema, collaudato, calibrato e interconfrontato si applicherà alla misura di campioni ottenuti in varie regioni di Italia, per costituire un livello di fondo in questa matrice. Per quanto riguarda l'aspetto radioprotezionistico e di calcolo si proseguirà questa attività tipicamente di carattere sanitario, con 1) la valutazione delle dosi ricevute dai bambini allattati al seno a causa dell'ingestione di radionuclidi delle madri in occasione dell'incidente di Chernobyl e quelle evitate a seguito dei provvedimenti restrittivi alimentari adottati durante l'emergenza; 2) calcolo dei livelli di riferimento derivati per alimenti e bevande della dieta della madre che possano comportare dosi di riferimento per il bambino allattato al seno nel caso di una nuova possibile emergenza radiologica 3) analoghe valutazioni potrebbero essere condotte per altre possibili esposizioni delle madri a radioattività naturale o naturale modificata dal lavoro umano.

Per quanto riguarda esposizioni a NORM, data la situazione di estremo disequilibrio che viene a crearsi nella catena dell'uranio e torio – diversa nelle diverse lavorazioni - si prevede di determinare, mediante anche misure sperimentali, la significatività dei diversi radionuclidi ai fini della dose alla popolazione.

Radiobiologia degli ioni pesanti

Sia l'ottimizzazione dell'efficacia clinica dell'adroterapia che la determinazione delle stime di rischio da radiazioni durante le missioni spaziali e i voli ad alta quota hanno come base comune lo studio degli effetti biologici di ioni pesanti.

L'attività prevede l'irradiazione di cellule umane coltivate *in vitro* presso acceleratori in Italia e all'estero. Verrà effettuato uno studio dell'Efficacia Biologica Relativa (RBE) per l'inattivazione e per l'induzione e riparazione del danno al DNA, di fasci di ioni utilizzati in adroterapia. Saranno studiati in particolare ioni carbonio, sia monoenergetici che modulati, e verranno utilizzate cellule umane, sia tumorali che derivanti da tessuti sani, con diversa radiosensibilità. Parallelamente, verrà implementato un modello teorico che, sulla base dei dati radiobiologici, cercherà di predire l'effetto di fasci misti, quali quelli terapeutici.

In relazione alla protezione degli equipaggi dalla radiazione spaziale, verrà studiato il danno al DNA cellulare a seguito di irradiazione con fasci di ioni ferro in assenza e in presenza di schermature. La determinazione degli spettri di frammentazione del DNA ottenuti nelle diverse condizioni servirà come guida per lo sviluppo e per la validazione dei modelli sugli effetti biologici di particelle pesanti cariche, basati sul concetto di correlazione spaziale delle lesioni nel DNA.

Risultati attesi nel triennio

Curve dose-risposta per l'inattivazione cellulare indotta da fasci monoenergetici e da fasci terapeutici modulati di ioni carbonio.

Valutazione della riparabilità del danno al DNA 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.

Determinazione degli spettri di frammentazione del DNA in funzione della qualità della radiazione.

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.

L'integrazione delle misure radiobiologiche con i codici di trasporto e di struttura di traccia delle particelle permetterà di ottenere indicazioni più attendibili sui rischi biologici e sulle esigenze di schermatura in relazione alle missioni interplanetarie e ai voli ad alta quota.

Il trasferimento dei risultati avverrà prevalentemente attraverso collaborazioni con Centri di adroterapia e con Laboratori dove sono presenti acceleratori di particelle, con pubblicazioni scientifiche e relazioni a congressi, nonché mediante gli strumenti informatici dell'ISS.

Ricerca e sviluppo per l'ottimizzazione di sistemi di trattamento in radioterapia oncologica

Obiettivo di questa attività è la creazione di un sistema completamente "aperto" con una struttura modulare in cui sia possibile inserire algoritmi per il calcolo della distribuzione di dose per fasci terapeutici di tipo diverso (fotoni, elettroni e protoni) e moduli di ottimizzazione da utilizzare per tecniche radioterapeutiche di tipo innovativo (es. IMRT).

Il raggiungimento di tale obiettivo si avvale dell'esperienza già maturata nel settore della pianificazione del trattamento in IMRT. Questa attività di ricerca fornirà uno strumento di verifica e confronto per sistemi di pianificazione del trattamento su diverse patologie.

Il confronto dei risultati avviene sia da un punto di vista fisico (distribuzione di dose), sia da un punto di vista radiobiologico, utilizzando modelli di tipo TCP/NTCP (*Tumour Control Probability/Normal Tissue Complication Probability*). Per sfruttare al meglio le nuove tecnologie è nostro obiettivo sviluppare strumenti di analisi d'immagini cliniche che garantiscano una selettività spaziale adeguata alla definizione dei volumi d'interesse clinico, completando così il processo di ottimizzazione dell'intero percorso radioterapico.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio sarà verificata la compatibilità del sistema di ottimizzazione della modulazione del fascio con le caratteristiche tecnologiche dei sistemi di collimazione e con le tecniche di rilascio di dose utilizzate nei centri di Radioterapia con cui sono attualmente in corso accordi di collaborazione. I risultati ottenuti saranno confrontati con i risultati ottenuti con simulazione MonteCarlo. Infine verranno utilizzate delle tecniche di segmentazione automatiche già sviluppate nell'ambito del gruppo di lavoro. Risultato finale sarà l'integrazione delle varie componenti in un sistema di pianificazione del trattamento completamente aperto che potrà essere utilizzato come sistema di *benchmark* per altri prodotti commerciali e per sistemi radioterapici non convenzionali (ad es. Radioterapia con protoni).

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a convegni, codice di calcolo

Ricostruzione della dose assorbita individuale

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 malevolente 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 campioni sia biologici, che non

biologici, ma comunque esposti insieme al soggetto durante l'incidente, da utilizzare come indicatori della dose ricevuta dall'individuo. Questi metodi sono ampiamente utilizzati nella verifica di dati dosimetrici negli studi epidemiologici condotti sulle popolazioni dell'ex Unione Sovietica e finalizzati all'analisi del rischio sanitario da radiazioni ionizzanti. Le tecniche che si intende utilizzare principalmente sono la risonanza paramagnetica elettronica, la termoluminescenza e la luminescenza otticamente stimolata. Tra le matrici biologiche più consolidate vi sono i tessuti contenenti idrossiapatite, in particolare i tessuti dentali.

Risultati attesi nel triennio

Verifica dei dati dosimetrici utilizzati in studi epidemiologici finalizzati all'analisi del rischio sanitario indotto dalle radiazioni ionizzanti (in particolare in popolazioni esposte durante incidenti nucleari nell'ex Unione Sovietica). Sviluppo di nuovi metodi e caratterizzazione di nuove matrici, biologiche e non, che possano rivelarsi utili per la ricostruzione retrospettiva di dose individuale.

Trasferibilità dei risultati

Le valutazioni dosimetriche effettuate in relazione alle più importanti coorti di popolazione esposta verranno utilizzate negli studi epidemiologici per la stima del rischio radiologico.

I metodi sviluppati per la misura retrospettiva della dose individuale potranno essere utilizzati nella gestione delle emergenze nucleari nell'ambito di reti di monitoraggio, sia a livello nazionale che europeo.

Ridefinizione dell'Anatomia Endodontica tramite microtomografica 3D

Gli studi anatomici sono serviti all'uomo per conoscere il proprio corpo e cercare di porre rimedi ad eventuali danneggiamenti che le sue parti potevano subire durante il corso della vita. Tramite osservazione diretta delle parti di cadaveri, si è ricavata e disegnata, in un primo tempo, l'anatomia umana. Molte altre metodiche, nel corso degli anni hanno contribuito allo studio e alla visualizzazione su atlanti dell'anatomia di organi, di muscoli e dello scheletro. Nel campo odontoiatrico, negli anni, sono stati sezionati innumerevoli elementi dentali di ogni tipo e si è riscontrata la estrema variabilità dell'anatomia dell'endodonto tra i singoli soggetti umani. La necessità degli studi anatomici per scopi didattici, ha portato a realizzare atlanti che forniscono un tipo di visualizzazione dell'anatomia molto generalizzata per quanto riguarda la struttura dei canali radicolari interni degli elementi dentali del cavo orale. Per quanto è stato possibile sono state pubblicate anche il maggior numero di anomalie, ma sempre ottenute e visualizzate tramite metodiche tradizionali e bidimensionali. Attualmente con l'utilizzo della microtomografica tridimensionale è possibile ridisegnare con risoluzione inferiore ai 20 micron e tridimensionalmente l'intero endodonto di qualsiasi elemento dentale, senza bisogno di nessuna azione distruttiva, che in passato poteva anche alterare la visualizzazione. Nell'ambito di quest'attività di ricerca ci si prefigge di ridisegnare l'anatomia dell'endodonto tramite microtomografica 3D, una nuova visualizzazione tridimensionale, acquisendo e ricostruendo tramite *software* specifico un numero considerevole di elementi dentali senza nessuna possibilità di alterazione del soggetto osservato. Per completezza si procederà all'analisi comparativa con immagini ottenute, successivamente alla microtomografica 3D, tramite la complessa tecnica di diafanizzazione degli stessi elementi dentali.

Risultati attesi nel triennio

Lo scopo principale di quest'attività di ricerca è proprio lo studio per la migliore visualizzazione tridimensionale dell'endodonto finalizzato alla conoscenza più approfondita della struttura canalare interna di un elemento dentale. Tale nuova visualizzazione e rappresentazione non sarà finalizzata solo a scopi didattici ma, secondo esperti odontoiatri che collaborano a questa ricerca, dovrà rivedersi anche tutta la metodica dei trattamenti endodontici.

Nello stesso tempo ci si prefigge di dare indicazioni più adeguate per una migliore progettazione della strumentazione che viene impiegata nelle terapie endodontiche. Una migliore conoscenza dell'anatomia dell'endodonto potrà inoltre contribuire a migliorare gli interventi nei confronti dei tessuti malati con la eliminazione del minor quantitativo possibile di tessuto dentale, molto importante per la preservazione, la conservazione e la cura del dente malato.

Trasferibilità dei risultati

Con la ridefinizione dell'anatomia endodontica, tramite la microtomografica 3D, entro breve sarà proposto e pubblicato un nuovo atlante anatomico dell'endodonto, che sicuramente rappresenterà un nuovo e più valido ausilio nell'attività didattica universitaria.

Con l'ausilio di questi risultati si prevede che le tecniche utilizzate per la preparazione e per le cure dell'endodonto saranno sicuramente meno distruttive nei confronti dei tessuti dentinali.

Una migliore conoscenza della struttura interna dell'elemento dentale porterà sicuramente a una nuova progettazione della strumentazione utilizzata e dei dispositivi per le cure endodontiche, con la conseguenza di ridurre l'atraumaticità delle terapie, per una migliore confortevolezza del paziente durante le cure.

Ruolo delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale nella risposta ai trattamenti farmacologici delle cellule tumorali

Le vie di trasduzione del segnale sono coinvolte in numerosi processi, quali proliferazione, differenziamento, morte cellulare. A livello molecolare la trasduzione del segnale coinvolge una cascata di proteine chinasi che trasmettono i segnali extracellulari al nucleo, con conseguente trascrizione genica. Numerosi studi sostengono l'ipotesi che tali vie controllino anche la risposta delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici. Infatti, alterazioni dei meccanismi di trasduzione possono causare un'alterata risposta citotossica ai farmaci e, in certi casi, una minore sensibilità contribuendo quindi al fenomeno della farmacoresistenza. Altri studi hanno inoltre dimostrato un'associazione tra la P-glicoproteina, molecola di trasporto di farmaci sovraespressa in cellule farmacoresistenti, e proteine chinasi C, A e MAPK, suggerendo che la risposta ai trattamenti chemioterapici possa essere influenzata da inibitori di proteine chinasi. Sulla base di tali considerazioni, verranno utilizzate coppie di cellule sensibili e farmacoresistenti di diverso istotipo (carcinoma umano della mammella e del colon, melanoma) che sono state utilizzate per precedenti studi di citotossicità e di cui si conosce la sensibilità a chemioterapici di uso in clinica (in particolare, antracicline). In queste linee cellulari sarà verificato se la differente risposta ai farmaci sia associata a una diversa espressione di alcune molecole di trasduzione (MAPK Erk1/2; tirosinchinasi Src; AKT). Successivamente verrà valutato se l'inibizione farmacologica di tali molecole di segnalazione (mediante composti che agiscono selettivamente sulle chinasi) aumenta la risposta citotossica al trattamento con farmaci antitumorali.

Risultati attesi nel triennio

Mediante *western blot* e citofluorimetria sarà studiata l'espressione di molecole di trasduzione del segnale (Erk1/2; AKT; Src) in linee tumorali umane sensibili e farmacoresistenti. A questo scopo saranno utilizzati anticorpi specifici contro la forma fosforilata di tali proteine per verificare se cellule sensibili e resistenti presentano un diverso grado di attivazione delle molecole. L'obiettivo successivo sarà quello di verificare se inibendo una o più molecole di trasduzione cambia la risposta al trattamento con la doxorubicina (una delle antracicline più usate in chemioterapia). A questo scopo le cellule verranno trattate con inibitori specifici delle proteine chinasi in combinazione con la doxorubicina. La risposta citotossica sarà valutata mediante conta delle cellule vitali alla fine dei trattamenti. Inoltre, la quantità e la localizzazione intracellulare di doxorubicina (sostanza con fluorescenza intrinseca)

accumulata in assenza e in presenza degli inibitori saranno valutate mediante citofluorimetria (studi di accumulo/efflusso) e microscopia confocale (studi di localizzazione). L'obiettivo finale è quello di aumentare la sensibilità ai farmaci antitumorali, soprattutto nelle cellule resistenti. Nel caso in cui il trattamento combinato (inibitore proteine chinasi-farmaco antitumorale) induca una maggiore risposta citotossica nelle cellule farmacoresistenti, si dovrà verificare se tale effetto si ottiene per interferenza da parte degli inibitori con l'espressione-funzione di proteine coinvolte nella farmacoresistenza (es. P-glicoproteina) o per meccanismi ad essa estranei.

Trasferibilità dei risultati

I risultati sperimentali di queste ricerche potrebbero fornire utili informazioni su nuove combinazioni di trattamento nella terapia antitumorale con lo scopo di aumentare la risposta citotossica ai farmaci quando usati in combinazione con inibitori delle proteine chinasi. Questo potrebbe rappresentare una nuova strategia per il superamento della farmacoresistenza. Diversi sono gli inibitori di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale che oggi già vengono usati in *trial* clinici per il trattamento di carcinomi del polmone, mammella, ovarico, renale. Questi inibitori vengono utilizzati da soli o in combinazione con farmaci antitumorali migliorandone la efficacia. Nei trattamenti in combinazione infatti vengono spesso somministrate dosi minori di farmaco riducendone in tal modo gli effetti collaterali negativi per i tessuti normali.

Ruolo del ferro nella modulazione dei fattori di virulenza di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* isolati da pazienti con fibrosi cistica

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica caratterizzata dalla mutazione del gene CFTR responsabile della regolazione del flusso di ioni e fluidi fra l'interno e l'esterno delle cellule. La sintomatologia polmonare è aggravata molto spesso dalla colonizzazione di batteri patogeni, soprattutto *P.aeruginosa* e *Burkholderia cepacia complex*, responsabili dell'instaurarsi di infezioni croniche di difficile eradicazione. Nei pazienti con FC la concentrazione di ferro libero è molto elevata rispetto ai soggetti sani. Il ferro determina, oltre che fenomeni infiammatori massivi a carico dei tessuti, anche la proliferazione e lo sviluppo di *biofilm* microbici responsabili della resistenza agli antibiotici. Come è noto, *P.aeruginosa* e *B. cepacia* sono capaci di acquisire il ferro attraverso vari meccanismi (proteine leganti il ferro, reductasi di membrana e siderofori che competono con le transferrine per l'acquisizione del ferro) ed è stato suggerito che il sovraccarico di ferro riscontrato nei pazienti con FC possa favorire la colonizzazione e la persistenza dei due batteri nelle vie aeree anche sotto massiccia terapia antibiotica.

Le vie aeree superiori sono anche caratterizzate dalla produzione di un antimicrobico naturale: la lattoferrina, una glicoproteina bilobata, facente parte dell'immunità innata non anticorpale, in grado di chelare gli ioni ferro. Il meccanismo dell'azione antimicrobica della lattoferrina sembra essere dovuto alla sua capacità di privare i batteri del ferro libero e questa attività risulta incrementata quando la proteina si adsorbe alla superficie batterica. Nei pazienti FC la concentrazione di lattoferrina così come quella degli ioni ferro è notevolmente incrementata, ma l'effettivo ruolo svolto dalla lattoferrina sulla modulazione degli ioni ferrici in questa particolare patologia non è ancora ben compreso.

Risultati attesi nel triennio

Dal momento che il ferro è un elemento fortemente coinvolto nell'espressione di geni di virulenza batterici, verrà studiata l'azione degli ioni ferro sull'aggregazione e la formazione di *biofilm* da parte di ceppi di *P.aeruginosa* e *B. cepacia complex* isolati da pazienti con FC, sia su superfici abiotiche che in presenza di substrati cellulari.

Parallelamente verrà studiata l'attività ferro-modulante della lattoferrina (nelle sue forme differenzialmente saturate in ferro) sull'espressione di differenti fattori di virulenza di *Pseudomonas* e *Burkholderia*. In particolare, verrà valutata la modulazione di quei fattori di virulenza che influenzano profondamente le capacità di adesione e di invasione dei microrganismi in esame su modelli cellulari *in vitro*. È noto che le specie appartenenti a *Pseudomonas* e a *Burkholderia* posseggono delle appendici di superficie (pili, fimbrie, flagelli) che possono mediare l'attacco e anche l'internalizzazione dei microrganismi nelle cellule ospiti. L'espressione e l'assemblaggio delle unità proteiche costitutive di queste appendici sono regolati dalla disponibilità di nutrienti e quindi anche dagli ioni ferro. Pertanto verrà valutata anche l'influenza del ferro e della lattoferrina sull'espressione e la strutturazione dei costituenti proteici dei pili e delle altre strutture di adesione e le conseguenze sui processi di adesività e invasività batterica.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di dati sull'influenza del ferro e della lattoferrina in forma apo, nativa e saturata in ferro sull'aggregazione batterica e lo sviluppo del *biofilm* da parte di *P.aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*. Identificazione dei fattori di virulenza batterici sottoposti alla modulazione da parte del ferro e della lattoferrina in rapporto all'adesione e all'invasione dei microrganismi su cellule epiteliali respiratorie *in vitro*. In base ai dati ottenuti sul ruolo regolatorio della lattoferrina, eventualmente verificati su modelli di fibrosi cistica *in vivo*, ci si potrebbe indirizzare verso l'utilizzo di questo antimicrobico da solo o in combinazione con gli antibiotici disponibili, nella terapia delle infezioni opportunistiche in pazienti con FC.

Ruolo della lattoferrina bovina, nativa o modificata nella protezione delle mucose dall'infezione da parte di virus e di batteri produttori di *biofilm*

La comparsa di patologie a carico delle mucose sostenute da microorganismi in grado non solo di aderire alle cellule dell'ospite, colonizzandole e producendo *biofilm*, ma anche di penetrare al loro interno, ha reso sempre più urgente la ricerca di nuove strategie terapeutiche. I batteri presenti nel *biofilm* o all'interno delle cellule dell'ospite, infatti, provocano patologie di difficile eradicazione a causa della loro resistenza alla maggior parte degli antibiotici conosciuti. Le mucose possono inoltre essere infettate da differenti virus che, oltre a provocare un danneggiamento di questa barriera naturale, possono favorire la superinfezione batterica rendendo anche in questo caso di estrema importanza l'individuazione di sostanze non tossiche che possano inibire la replicazione virale.

La lattoferrina è una glicoproteina appartenente alla famiglia delle transferrine composta da due lobi (lobo N e lobo C), ognuno in grado di chelare un atomo di ferro. Questa proteina multifunzionale è presente ad elevate concentrazioni nel latte e nel colostro e in diverse secrezioni quali saliva, lacrime, essudati nasali, muco bronchiale e cervico-vaginale, fluidi gastrointestinali e fluido seminale. La lattoferrina, che è considerata una tra le più importanti proteine dell'immunità naturale non anticorpale, è inoltre presente nel plasma e nei granuli dei leucociti polimorfonucleati che la rilasciano in seguito a vari stimoli. La principale funzione di questa proteina è da ricondurre alla sua capacità di sottrarre il ferro non legato dai fluidi corporei e dalle aree di flogosi, così da evitare il danno prodotto dai radicali tossici dell'ossigeno e diminuire la disponibilità di ioni ferrici per i microorganismi che invadono l'ospite.

Risultati attesi nel triennio

Il ferro, come è noto, è un elemento indispensabile per le cellule viventi e nei batteri è fortemente coinvolto nell'espressione dei geni di virulenza. Uno degli obiettivi del progetto è la valutazione dell'attività della lattoferrina sia sull'adesione batterica che sull'aggregazione e

sullo sviluppo del *biofilm* microbico. In particolare sarà studiata l'attività sia della lattoferrina in forma apo, in grado quindi di sottrarre ferro ai microorganismi, che della preparazione completamente satura, che può rilasciare il ferro rendendolo disponibile per i batteri. Questi studi saranno condotti su batteri Gram-negativi e Gram-positivi nei quali, come è noto, la ferro-modulazione genica di alcuni fattori di virulenza è profondamente diversa.

Sarà inoltre studiata l'attività antivirale della lattoferrina in diversi modelli virus-cellula. In particolare gli studi saranno rivolti ad 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. Questi studi hanno come obiettivo la caratterizzazione dell'attività del lobo N, del 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 sarà analizzata l'attività di preparazioni della proteina differentemente sature in ferro per valutare l'eventuale importanza di questo metallo nel modulare l'infezione virale nei nostri sistemi sperimentali.

Trasferibilità dei risultati

La disponibilità di dati sull'attività della lattoferrina in forma apo, nativa e satura in ferro sull'aggregazione batterica e lo sviluppo di *biofilm* microbici fornirà la base per lo sviluppo di eventuali nuove strategie terapeutiche antimicrobiche.

L'identificazione dei bersagli molecolari sensibili all'azione antibatterica delle diverse forme della glicoproteina porterà a comprenderne il meccanismo d'azione.

L'identificazione delle componenti della lattoferrina responsabili dell'attività antivirale aggiungerà informazioni essenziali utili a caratterizzare le 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 delle componenti precedentemente identificate porterà a comprenderne il meccanismo d'azione.

Set-up di un ambiente di certificazione dei dispositivi protesi acustiche

Scopo del progetto è quello di ricreare l'ambiente di laboratorio per certificare le protesi acustiche. Consisterà nell'allestimento di:

- una camera anecoica
- un sistema di calibrazione
- un sistema di generazione di *pattern* acustici
- un sistema di registrazione digitale

Set-up di un ambiente di certificazione per protesi articolari arto superiore, con particolare riferimento al polso-mano, spalla-gomito

Scopo del progetto è quello di creare un ambiente di laboratorio per certificare tali protesi che consisterà in particolare in :

- un sistema di trazione e torsione
- un sistema di calibrazione
- un sistema di generazione di *pattern* meccanici
- un sistema di registrazione digitale
- un software dedicato di analisi dati

Sistema RFID per la tracciabilità del paziente in strutture ospedaliere

All'interno di una struttura sanitaria circolano elevati volumi di informazioni relative ai medicinali da somministrare agli ammalati, agli esami da eseguire, ai risultati delle analisi, alle diagnosi e al quadro clinico sino alla dimissione del paziente. Tutti questi dati vengono solitamente registrati dal personale su supporto cartaceo e successivamente trasferiti nell'archivio informatizzato del reparto e in quello centralizzato della struttura. Il processo di trascrizione dei dati incrementa la probabilità di errore dovuto alla difficoltà d'interpretazione delle grafie e al rischio di inserire i dati in una posizione non corretta; detta probabilità d'errore aumenta nel caso, assai frequente, di trasferimento di un paziente da un reparto a un altro. Cosa può fare la tecnologia in questo caso? Il sistema più evoluto attualmente in uso è quello che prevede l'utilizzo di una codifica a barre stampata su etichette adesive, che di volta in volta vengono applicate sulla documentazione clinica del paziente, la codifica contiene un *set* minimo di informazioni che possono essere lette mediante un dispositivo ottico connesso ad un opportuno sistema informatico. Una valida alternativa è rappresentata dalla tecnologia RFID (*radio frequency identification*), di recente introduzione anche nel settore dell'ingegneria clinica, che mostra notevoli vantaggi, in termini di affidabilità, efficienza, versatilità e capacità di contenere informazioni, rispetto ai vecchi codici a barre.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo degli studi sarà quello di valutare l'applicazione di questa nuova tecnologia in campo ospedaliero, utilizzando un sistema appositamente progettato per garantire la tracciabilità del paziente dall'accettazione fino all'abbandono dei locali ospedalieri, minimizzando il rischio di scambio dei dati clinici tra pazienti, diagnosi e terapie. Il sistema da sviluppare per la valutazione sarà costituito da:

- tag* RFID di tipo passivo riscrivibile operanti sulla frequenza 13,56 MHz, dotati di un numero seriale univoco e non modificabile e di una memoria riscrivibile con capacità fino a 4 Kbits; i dispositivi sono inseriti in un bracciale da applicare al paziente o su etichette adesive e sono riutilizzabili dopo la dimissione;

- terminali di tipo palmare dotati di modulo di prossimità per la lettura/scrittura di *tag* RFID e di connettività *wireless* con il sistema informativo centrale;

- sistema informativo centrale contenente il *database* per la gestione della cartella clinica elettronica.

Le attività principali da svolgere saranno lo sviluppo dell'intero sistema *hardware/software* basato sulla tecnologia RFID e integrato dalle necessarie risorse telematiche ed elaborative; seguirà una seconda fase di sperimentazione sul campo e infine una fase di *technology assessment*, necessaria per valutare l'impatto di questa nuova tecnologia con l'ambiente ospedaliero, dal paziente all'operatore sanitario, dalle infrastrutture alla strumentazione.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità all'interno del SSN dei risultati previsti dal progetto, ai fini del miglioramento della qualità e dell'appropriatezza degli interventi a tutela della salute, è assicurata dall'utilizzo di tecnologie informatiche, che ben si integrano all'interno di sistemi preesistenti per la gestione di organizzazioni multiprofessionali complesse e stratificate quali quelle del settore ospedaliero, e dall'impiego di dispositivi (*computer* palmari, etichette adesive contenenti i *tag* RFID) per i quali l'utente finale è già in possesso di una discreta familiarità.

Sistemi di calcolo distribuito per applicazioni in fisica medica: uso di codice Monte Carlo GEANT4

Obiettivo di questa attività di ricerca è sviluppare e accrescere una competenza, già esistente nel Reparto di Modelli di sistemi complessi e applicazioni alla stima dei rischi, sull'utilizzo di sistemi di calcolo distribuito e parallelo per le applicazioni in campo medico.

La proponente del progetto è impegnato su questo fronte attraverso un'attività basata sullo studio dell'ottimizzazione fisico-matematica per i piani di cura in radioterapia innovativa, in particolare per le tecniche che utilizzano fasci a intensità modulata (IMRT). Il recente allestimento di un *cluster* di 30 nodi di calcolo è stato inoltre il germe dell'avvio di un'attività di studio su codice MC (GEANT4) in fisica medica, per applicazioni in campo radioterapeutico e diagnostico.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio ci si propone di raggiungere i seguenti obiettivi:

Sviluppo di una procedura di ottimizzazione dei piani di cura in IMRT da distribuire su *cluster* di nodi di calcolo, evoluzione di quella sviluppata dal gruppo coordinato dalla proponente, che faccia uso di Geant4 come MC per il calcolo della dose assorbita dal paziente irraggiato. Il raggiungimento di questo obiettivo fornirebbe un indispensabile supporto a un sistema di pianificazione del trattamento in radioterapia oncologica aperto e utilizzabile sia per attività di ricerca che come riferimento per sistemi commerciali in uso nella pratica clinica.

Utilizzo di Geant4 come MC per lo studio di casi clinici con geometria complessa (distretto testa-collo), e più in generale per lo studio delle problematiche di calcolo di dose relative alle lesioni tumorali in sezioni eterogenee, come il polmone. In questo caso gli algoritmi di calcolo convenzionali mostrano dei grossi limiti di tipo fisico legati alla corretta valutazione dell'equilibrio elettronico. La simulazione MC può fornire indicazioni relative alla correzione della modulazione del fascio al fine di ottenere il raggiungimento della prescrizione terapeutica.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, partecipazioni a convegni, disponibilità di codice di calcolo

Strategie comportamentali e di controllo nella coordinazione tra percezione e azione

In anni recenti si sta osservando una promettente integrazione di diverse discipline verso la comprensione dei processi di controllo operati dall'uomo, siano essi volti ad aspetti motori, verbali o più in generale comportamentali. Per l'indagine sul controllo umano delle proprie azioni è indispensabile considerare diversi fattori da quelli anatomici e biomeccanici a quelli cognitivi. I modelli funzionali e cognitivi più influenti prevedono la segregazione in stadi separati di aspetti funzionali e/o anatomici e una organizzazione gerarchica degli stessi. Si pensi ad esempio alla divisione concettuale tra percezione e azione quasi fossero due funzioni tra loro indipendenti. Le moderne evidenze offerte dalle neuroimmagini stanno tuttavia aprendo nuovi fronti per la comprensione dei processi di controllo. Da una prima fase di entusiastico studio di aspetti neuroanatomici, tesi ad individuare le sorgenti dei processi, si è più recentemente passati alla ricerca di percorsi neurali funzionali, di attività cerebrali sincronizzate. L'attenzione si sta progressivamente spostando verso una ricerca sulle interazioni tra componenti piuttosto che sull'individuazione delle componenti. Al contempo si stanno intensificando i modelli basati sulla criticità di sistemi auto-organizzati, sul caos deterministico e sulla casualità multiscala, tutti caratterizzati da un *focus* sulle interazioni tra componenti.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo del progetto è di indagare quei fattori che concorrono all'attività umana di controllo, sia automatico che volontario, delle proprie azioni. In particolare si intende individuare i meccanismi che contribuiscono a una efficace sincronizzazione sensomotora al fine di gettare luce sul rapporto tra percezione e azione. I fenomeni di *entrainment* rappresentano un terreno fertile di analisi di tale rapporto, numerose evidenze mostrano infatti che stimoli acustici ritmici condizionano e 'agganciano' la nostra *performance* motoria; al contempo studi più recenti evidenziano come l'esperienza motoria influenzi le nostre abilità e strategie percettive.

Trasferibilità dei risultati

L'abilità umana di sincronizzare le proprie azioni ad eventi esterni ripetuti e di mantenere movimenti ripetitivi stabili, sono alla base di gran parte delle attività quotidiane. Un parametro di interesse è la variabilità nella *performance* di tali capacità.

Numerosi studi hanno analizzato tale variabilità in relazione a diverse patologie del sistema nervoso centrale e del sistema muscolo-scheletrico. Ad esempio, è stato mostrato come un supporto ritmico in modalità acustica possa migliorare sensibilmente il controllo motorio e verbale in soggetti affetti da Parkinson. Recentemente è stato osservato come diversi tipi di patologie cerebellari producano caratteristiche variabilità di movimenti ritmici e non compromettano il fenomeno *dell'entrainment*.

Un supporto di tipo ritmico può contribuire al successo di un *training* motorio o verbale, sfruttando gli stretti legami tra percezione e azione, tra sensoriale e motorio, attraverso il rafforzamento di strategie fondate su processi cognitivi quali l'attenzione e la memoria.

Strumenti e Metodi per la valutazione, il mantenimento e il recupero dell'abilità motoria

È il naturale proseguimento di progetto precedente. Viene svolto secondo 4 linee principali: 1) controllo neuromotorio del cammino; 2) valutazione del danno motorio; 3) valutazione della disabilità; 4) riabilitazione motoria.

1) L'attività sperimentale, per la quale si utilizzeranno sistema di allevio del peso e dispositivi per la restituzione sensoriale del contatto piee-suolo, proseguirà presso l'IRCCS S. Lucia.

2) Si proseguirà la messa a punto di dispositivi e metodi di misura attraverso le applicazioni. Si continuerà in particolare la valutazione della mano.

3) Si continuerà a seguire l'approccio della misura in laboratorio della risposta motoria a compiti che mimano quelli quotidiani. In particolare si curerà l'applicazione di sistema originale basato su scala strumentata.

4) Si continuerà la messa a punto di metodi basati su *biofeedback* da strumenti che contemporaneamente consentono una valutazione della abilità motoria. Nell'ambito di una collaborazione di ricerca con il Centro Protesi dell'INAIL (ente finanziatore) si svilupperanno procedure per l'addestramento alla deambulazione con protesi di arto inferiore, utilizzando un *tapis roulant* strumentato, sviluppato nell'ambito di una precedente collaborazione. Per verificare la possibilità di intraprendere un'attività di valutazione di efficacia e appropriatezza di ortesi per la riabilitazione si userà come banco di prova uno studio per la realizzazione di ortesi plantari per il compenso di sovraccarichi nel piede sano di paziente protesizzato.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione, perfezionamento e messa a punto di nuove apparecchiature e di metodi di valutazione del danno motorio e della disabilità. Protocolli di riabilitazione basati sull'uso di

nuove apparecchiature e adattabili sul singolo paziente tenendo conto di valutazioni oggettive delle sue capacità motorie. Definizione di nuovi percorsi diagnostici e terapeutici.

Identificazione di percorsi efficaci di assistenza e cura, ottimizzando le risorse economiche, per mantenere la funzione, prevenire ulteriori disabilità e migliorare la qualità della vita di pazienti affetti da *stroke* cronico (progetto ISS/NIH). Nuovi dispositivi atti per svolgere una attività di riabilitazione a domicilio del paziente.

Protocolli di valutazione e rieducazione funzionale per bambini con malattie degenerative (in particolare con sindromi atassiche e distoniche), mediante l'uso di dispositivi appositamente sviluppati.

Eventuale progetto per un'attività di valutazione di efficacia e appropriatezza di apparecchiature e ortesi per la riabilitazione.

Trasferibilità dei risultati

La collaborazione con centri clinici si ritiene sia presupposto importante per la trasferibilità dei risultati, potendosi validare sul campo l'efficacia della strumentazione e dei metodi messi a punto. Al completamento della ricerca saranno disponibili dati preliminari di validazione.

La brevettazione sarà, come in passato, presa in considerazione per la promozione della realizzazione su base industriale delle dispositivi ideati.

Si curerà inoltre la pubblicazione dei risultati su riviste a diffusione internazionale e la formazione dei potenziali fruitori attraverso *workshop* e piattaforme per la formazione a distanza (*e-learning*)

Studi epidemiologici sui rischi sanitari connessi all'esposizione alla radioattività di origine naturale

Le attività si articolano come segue:

A) Completamento dell'analisi dati dello studio caso-controllo sul rischio di tumore polmonare connesso all'esposizione alla radioattività naturale nelle abitazioni del Lazio, in collaborazione con il Dip. di Epidemiologia dell'ASL RM E. Questo studio è inserito nel pool degli studi europei. I risultati del rischio da esposizione al radon (sia dello studio nel Lazio che del *pooling* europeo) sono stati pubblicati nel 2005. Lo studio nel Lazio ha però alcune peculiarità in quanto, oltre al radon, è stata valutata l'esposizione dei soggetti anche alla radiazione gamma.

B) Analisi dati di tutti gli studi epidemiologici su tumore polmonare ed esposizione al radon nelle abitazioni e confronto delle stime di rischio con quelle ottenute con gli studi su coorti di minatori. Questa attività si realizzerà nell'ambito di un progetto europeo ("*Alpha Risk*") e di uno dell'OMS ("*International Radon Project*").

C) Analisi dati dello studio SETIL (Studio epidemiologico multicentrico italiano sull'eziologia dei tumori del sistema linfopoietico e del neuroblastoma nel bambino epidemiologico), nell'ambito del quale è stata determinata sperimentalmente l'esposizione dei soggetti alla radiazione gamma in Lazio, Campania e Piemonte, ed è stato messo a punto un metodo teorico-sperimentale ("*IN-OUT*") per la stima accurata del rateo di dose assorbita da radiazione gamma nelle abitazioni, sulla base di misurazioni effettuate all'esterno delle stesse.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi per il prossimo triennio sono i seguenti:

A1) Stima del rischio di tumore polmonare associato all'esposizione alla radiazione gamma nelle abitazioni; A2) stima dell'eventuale interazione sinergica tra radiazione gamma e radon; A3) Valutazione delle incertezze nell'esposizione al radon e alla radiazione gamma e loro impatto sulle valutazioni di rischio

B1) Stima (la più precisa attualmente possibile) del rischio relativo di tumore polmonare dovuto all'esposizione al radon, e confronto con le stime ottenute dagli studi sui minatori; B2) Stima del rischio di tumore polmonare e esposizione al radon stimata con tecniche retrospettive in un sottinsieme di soggetti degli studi caso-controllo europei; B3) valutazione delle incertezze associate all'esposizione al radon e loro impatto sulle stime di rischio; B4) stima dell'impatto sanitario dell'esposizione al radon in Italia e altri Paesi europei.

C1) Stima del rischio di leucemia infantile e neuroblastomi associato all'esposizione alla radiazione gamma, e confronto con i risultati dei pochi altri studi preesistentemente effettuati; C2) Ulteriore sviluppo del metodo *IN-OUT*, con analisi della sensibilità del metodo ai valori dei parametri del modello e raggruppamento di tali parametri in poche classi.

Trasferibilità dei risultati

- Pubblicazioni scientifiche
- Comunicazioni a convegni
- Normative nel settore della radioprotezione

Studio dell'osseointegrazione tramite indagine istologica e microtomografica

Gli impianti dentali sono attualmente costituiti da una vasta classe di tipologie, che differiscono fra loro per le caratteristiche dimensionali, per la conformazione superficiale, per il rivestimento o il trattamento superficiale e per il collegamento tra la parte impiantabile e la sovrastruttura (*fixture-abutment*). Per l'ottenimento di un successo a lunga durata è importante seguire strategie adeguate in funzione della patologia da trattare. La valutazione del rischio di rigetto dell'impianto è un processo complesso che implica l'uso di varie tecniche e metodiche, già utilizzate in ISS e che si intende usare in questa ricerca. Per favorire la neoformazione ossea saranno utilizzate proteine morfogenetiche stimolanti la ricrescita ossea e cellule staminali di provenienza animale. Inoltre sarà necessario realizzare sia modelli sperimentali su animali, sia la strumentazione *ad hoc* per la simulazione del ciclo carico masticatorio e per la valutazione biomeccanica del sistema osso-impianto caricato precocemente.

I risultati di questa ricerca saranno utilizzati per predisporre protocolli standardizzati per la valutazione degli impianti dentali e della loro osteointegrazione anche in situazioni di carico precoce. Questo fine può essere raggiunto grazie allo studio dei parametri biomeccanici descrittivi del recupero funzionale orale quali la resistenza meccanica del complesso impianto-sovrastruttura, fine vita tramite stress meccanico a fatica, resistenza dell'osteointegrazione tramite applicazione di sforzo di taglio e stimolazione con stress ciclici a fatica (da 1 a 5 milioni).

Il modello sperimentale, prevede l'impiego di animali in cui nei femori saranno allestiti sia i siti di impianto in presenza delle sostanze da testare che i siti di controllo. La valutazione delle caratteristiche biomeccaniche, in condizioni statiche e dinamiche, del complesso osso-impianto, anche mediante simulazione di stress masticatorio, verrà effettuata tramite lo studio e la messa a punto di protocolli di prova specifici *in vitro*. Le valutazioni istomorfometriche e qualitative dell'osteointegrazione del complesso osso-impianto integro e dopo l'effettuazione di prove meccaniche, verrà eseguita mediante tecniche istologiche e di microtomografica tridimensionale.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca in oggetto si propone di realizzare una serie di prove tecnologiche complete per un'indagine sulle caratteristiche biomeccaniche *in vivo* e *in vitro* di dispositivi impiantabili dentali al fine del miglioramento della loro valutazione e dell'osteointegrazione. L'esigenza di attuare lo studio proposto nasce innanzitutto dal gran numero di applicazioni di tali dispositivi, di vario genere e tipo, utilizzati in ambito clinico in tutto il mondo.

La strumentazione e le metodiche che verranno messe a punto permetteranno la valutazione dell'affidabilità dei dispositivi e dell'efficacia delle tecniche utilizzate per migliorare l'osteointegrazione precoce, con particolare riguardo alla valutazione biomeccanica del caricamento precoce del sistema osso-impianto che costituisce la vera verifica funzionale dei dispositivi stessi.

L'obiettivo finale della ricerca proposta è assicurare la riabilitazione estetica e funzionale del soggetto edentulo totale o parziale in condizioni recuperabili attualmente solo con impiego di protesi rimovibili e con tempi di attesa tra impianto e carico protesico spesso invalidanti. L'obiettivo è relativo all'ottenimento della riabilitazione orale tramite impianti effettuati in condizioni ossee scadenti come quelle riscontrabili in soggetti anziani, con pregressi traumi, o con disturbi del metabolismo osseo, in tempi più rapidi riducendo la probabilità di insuccessi dell'osteointegrazione

Trasferibilità dei risultati

L'attività di ricerca proposta prevede l'implicazione di diverse competenze già presenti in ISS, con una integrazione di queste rivolta principalmente alla sperimentazione su animale e su uomo. Le collaborazioni previste porteranno alla definizione delle variabili e delle procedure al fine di mettere a punto una serie di prove per la valutazione del recupero funzionale ottenibile tramite impianti inseriti con proteine morfogenetiche e caricati precocemente al fine di una più veloce e economica riabilitazione orale

In questo quadro, i risultati della ricerca, considerati in una favorevole prospettiva, potrebbero avere ricaduta anche per altri tipi di impianto in cui è coinvolto il fenomeno della osteointegrazione quali, ad es., le protesi d'anca o del ginocchio, con vantaggi per la salute, la qualità della vita e anche per l'economia dell'Azienda Sanitaria.

Da un punto di vista sociale, la ricerca che si propone potrà contribuire al miglioramento della qualità della vita, con particolare riguardo all'importanza dell'apparato stomatognatico nella vita di relazione e funzione, riducendo i tempi di assistenza al paziente e di conseguenza i costi per l'Azienda Sanitaria.

L'interesse scientifico del progetto e la sua trasferibilità risulta in accordo con gli obiettivi del Piano Sanitario Nazionale, che si fanno carico di portare l'Italia a livello degli altri paesi europei in grado di fornire riabilitazioni orali protesiche anche con impianti endoossei. In tale ottica, risulta evidente l'importanza di ridurre l'impegno economico da sopportare abbassando la percentuale di insuccessi legata alla mancata osteointegrazione di impianti.

Studio delle relazioni morfo-funzionali tra la resistenza agli agenti antineoplastici e il potenziale invasivo delle cellule di melanoma

La scarsa sensibilità del melanoma ai trattamenti terapeutici è dovuta sia a caratteristiche di "sopravvivenza" intrinseche nei melanociti parentali, sia ad alterazioni successive acquisite dapprima nel corso della progressione tumorale e, più tardi, in corso di trattamento terapeutico. Per quanta riguarda quest'ultime, esse vedono coinvolte le proteine del *pathway* apoptotico, i sistemi enzimatici di detossificazione e di riparo del DNA, l'azione di famiglie di proteine trasportatrici che mediano il trasporto degli agenti antineoplastici al di fuori della cellula tumorale. Dati sperimentali e clinici indicano sempre con maggiore evidenza l'esistenza di relazioni strutturali e funzionali tra il fenotipo farmacoresistente e il comportamento aggressivo e metastatico di vari tumori e, generalmente, tumori più metastatici mostrano una resistenza maggiore ai trattamenti chemioterapici. Per il melanoma il fenotipo polifarmacoresistente mediato dalla proteina trasportatrice P-glicoproteina (MDR1, P-gp) sembra essere associato ad una maggiore aggressività tumorale, anche se il reale contributo della P-gp rimane tuttora da chiarire. Scopo di questo progetto sarà quindi quello di valutare il coinvolgimento del

trasportatore MDR1 nei processi di migrazione e invasione di cellule di melanoma in cui è stato indotto un fenotipo P-gp positivo. Gli studi verranno effettuati mediante “*transwell chamber invasion assay*” associato a tecniche di colture cellulari, metodiche morfologiche ultrastrutturali (LSCM, SEM, TEM, crioultramicrotomia e FF), di biologia molecolare (RT-PCR, *western blotting* ecc.).

Risultati attesi nel triennio

Risultati attesi nel primo anno: individuazione dei comportamenti di migrazione cellulare adottati dalle cellule di melanoma farmaco-resistenti. Il melanoma cutaneo è un tumore intrinsecamente resistente ad alto rischio di estensione metastatica. È noto dalla letteratura che le cellule tumorali possono adottare diversi comportamenti invasivi (mesenchimale vs ameboide, individuale vs collettivo) ciascuno dei quali riflette il coinvolgimento di fattori cellulari differenti (mediatori *out-in* di segnali intracellulari, fattori di trascrizione e secrezione di enzimi specifici). Risultati attesi nel secondo e terzo anno: ruolo della P-gp nei *pathway* di segnalazione intracellulare coinvolti nei meccanismi di invasione e di sopravvivenza delle cellule di melanoma farmaco-resistenti. I diversi comportamenti invasivi possono o meno essere associati a meccanismi di sopravvivenza cellulare che vanno da una aumentata espressione di proteine detossificanti, quale la P-gp, ad una diversa o alterata espressione di proteine pro-apoptotiche o differenti *pathway* di segnalazione intracellulare chinasi-mediata, fino a una diversa produzione di proteasi. Per quanto riguarda queste ultime, dati recenti indicano che i comportamenti invasivi delle cellule tumorali possono essere anche del tutto indipendenti dalla produzione delle metalloproteinasi, e questo potrebbe rendere conto del perché attuali *trial* clinici che prevedono l'impiego di inibitori delle metalloproteinasi in molti casi risultano essere del tutto inefficienti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti nel corso del prossimo triennio, oltre a contribuire a chiarire alcuni aspetti biologici delle caratteristiche di malignità delle cellule di melanoma (invasività e farmaco-resistenza), potranno fornire utili indicazioni per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche contro il melanoma umano. Soprattutto se i dati ottenuti *in vitro* potranno essere confermati in modelli sperimentali animali, è ragionevole supporre che l'impiego di sostanze chemiosensibilizzanti, capaci di far regredire il fenotipo farmaco-resistente, potrebbero avere un aspetto benefico anche sulle caratteristiche di proliferazione e invasività.

Studio delle sorgenti di radioattività naturale e dell'uranio impoverito

A) Sorgenti di radioattività naturale negli ambienti chiusi: questa attività di ricerca si articola nelle quattro linee di seguito riassunte: 1) 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, di recente acquisizione, per la misura di emettitori gamma di bassa energia; 2) validazione di un metodo per la valutazione del rateo di dose da radiazione gamma *indoor* sulla base di misure eseguite all'esterno di un edificio; 3) 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; 4) studio del problema della radioattività naturale nelle acque potabili, termali e minerali in quanto sorgente di esposizione della popolazione italiana.

B) Uranio impoverito: raccolta, catalogazione e analisi della letteratura scientifica riguardante la problematica dell'uranio impoverito e raccolta, catalogazione e revisione critica della “letteratura grigia” e di altra documentazione di interesse sull'argomento; affinamento delle tecniche di spettrometria gamma per la misura della concentrazione di attività dell'uranio;

applicazione di un approccio probabilistico alla stima del rischio, finalizzato alla stima intervallare del rischio.

Risultati attesi nel triennio

A) Validazione del metodo di correzione di artefatti nelle misure di spettrometria gamma di radionuclidi naturali anche attraverso interconfronti con altri laboratori; analisi e 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 del radon nell'acqua e studio di fattibilità per lo studio di nuove tecniche per la misura del ^{210}Po e ^{210}Pb nelle matrici liquide.

B) 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; lo sviluppo e la realizzazione di strumenti che permettano una divulgazione chiara e accessibile delle conoscenze scientifiche ai media e al pubblico. Si prevede inoltre la conclusione della parte sperimentale relativa alla spettrometria gamma e l'inizio di una analisi di fattibilità sulla possibile applicazione all' ^{90}Sr impoverito del sistema per la misura rapida dello ^{90}Sr nel latte.

Studio di metodologie e tecnologie diagnostiche a supporto della cardiologia (pediatrica e non), cardiologia interventistica e chirurgia cardiovascolare

Si intende sviluppare nuove tecnologie *in vitro* e *in vivo* a supporto della cardiologia, cardiologia interventistica e chirurgia cardiovascolare, realizzando sistemi di simulazione numerica e fluidica basati su dati di risonanza magnetica, angiografici e eco-doppler orientati in special modo al monitoraggio delle condizioni chirurgiche realizzate all'impianto. In particolare saranno usate le tecniche *laser* messe a punto dal Gruppo di Biomeccanica Cardiovascolare. Inoltre si intende progettare strumentazione specifica sia per indagini *in vitro* (ad es NMR e *Echo Color Doppler*) che *in vivo* (su animale), al fine di migliorare la detezione di alcuni parametri biomeccanici e fluidodinamici mediante l'ottimizzazione di algoritmi di stima.

Saranno proposte reti e ambienti di lavoro virtuali per la realizzazione di ambienti collaborativi tra centri mediante l'uso del *World Wide Web*, mediante *database* di dati sulla funzionalità di dispositivi medici o di particolari realizzazioni chirurgiche, orientate in particolare alla didattica specialmente chirurgica e disseminazione di dati. Verranno eseguiti studi sia *in vivo* che *in vitro* di dispositivi medici quali *stent*, cannulazioni per la circolazione extracorporea, pompe per l'assistenza meccanica al circolo per una definizione biomeccanica della efficienza della fluidodinamica realizzata in termini di vortici, separazione dei flussi, perdite di energia.

Per minimizzare l'impatto e l'invasività delle metodiche diagnostiche i risultati degli studi menzionati verranno utilizzati per ottenere miglioramenti significativi relativamente agli algoritmi per sistemi ad ultrasuoni e angiografici.

Risultati attesi nel triennio

Studio delle condizioni di miglior perfusione nel caso di PTCA con *stent* coronarici e realizzazione di TCPC (Fontan). Studio in simulazione numerica e *in vitro* delle condizioni di cannulazione orientate alla riduzione delle complicanze nel caso della circolazione extracorporea. Messa a punto di indici per lo studio della contrattilità cardiaca da usarsi nel caso di assistenza circolatoria *in vivo*. Studi della emolisi dovuta all'uso dei dispositivi protesici per il sistema cardiovascolare in particolare docuta a fenomeni turbolenti. Messa in linea sul WEB di

un *database* interattivo per lo scambio di dati 3D fluidodinamici, percorsi di disseminazione e studio mediante dispositivi *in vitro* per applicazioni chirurgiche e olografici.

Trasferibilità dei risultati

Studio di percorsi per la didattica clinica relativamente all'uso di dispositivi medici e tecniche chirurgiche innovative. Disponibilità di nuovi algoritmi per la detezione di parametri rilevanti per la valutazione delle prestazioni di impianti nella clinica.

Studio di prototipo di sistema aviotrasportato per la misura della radioattività

È stato strumentato un aereo superleggero che ha la capacità di effettuare prelievi di campioni d'aria in quota e misurare *on line* l'attività degli emettitori gamma del particolato depositato su filtro. Tale capacità permette di fornire, sin dalle prime fasi, informazioni al sistema di gestione delle emergenze che si determinano a seguito di rilascio in aria di radionuclidi per motivi incidentali o intenzionali. La strumentazione permette anche la rilevazione di contaminazione radioattiva a terra, quale quella che si può determinare a seguito di rientro incontrollato di satelliti energizzati con sistemi che usano, in vari modi, energia nucleare o di sorgenti disperse o nascoste sul territorio anche a seguito di furti dolosi. Tale sistema di rilevazione è unico nel contesto nazionale e internazionale.

Risultati attesi nel triennio

Dimostrazione della funzionalità della strumentazione in volo in varie condizioni meteorologiche, acquisizione dati per misure dei livelli di fondo naturale in varie configurazioni geologiche del territorio. Nella seconda fase il controllo dell'acquisizione e la ricezione dei dati avverrà direttamente dalla sala controllo di un centro di emergenza. Dimostrazione della fattibilità di operare il sistema su un mezzo UAV (*unmanned air-vehicle*).

Trasferibilità dei risultati

Il sistema una volta provato può divenire parte integrata nel sistema di emergenza radiologica e nucleare. Il *know-how* può essere trasferito all'industria per essere commercializzato.

Studio di sistemi lipidici modello e della loro interazione con proteine di membrana

Proteine che interagiscono fortemente con membrane cellulari (?A, ?S, Pr e Pgp) sono alla base d'importanti fisiopatologie quali l'Alzheimer, il Parkinson, la Creutzfeld-Jacob o la multifarmaco resistenza, cioè quel fenomeno che è alla base dell'insuccesso in chemioterapia. È sempre più chiaro che i lipidi non fungono soltanto da matrice passiva nel funzionamento di queste proteine ma che, interagendo con esse, ne determinano la struttura e l'aggregazione controllandone la funzione biologica. Lo studio di questa interazione è quindi fondamentale nella progettazione di nuovi farmaci e, non di meno, è alla base della preparazione di sistemi per il loro trasporto e rilascio (liposomi, *lipoplexy*). Si utilizzerà la tecnica di Langmuir per preparare monostrati composti da lipidi, gangliosidi e colesterolo. Parallelamente si prepareranno liposomi quali modelli di doppiostrato. Entrambi i modelli saranno messi in contatto con molecole d'interesse biologico (calcitonina, porfirine, DNA). Misure di compressione forniranno informazioni sulle fasi del mosaico lipidico costituente i monostrati e sulle influenze esercitate dall'interazione con le proteine. La microscopia ad angolo di Brewster permetterà di studiare la morfologia dei monostrati all'interfaccia acqua-aria. I monostrati, depositati su supporti solidi, saranno infine studiati con risoluzioni nanometriche mediante AFM. I liposomi saranno invece studiati con EF-TEM e CD. Queste tecniche forniranno una

visualizzazione diretta sia dei lipidi costituenti i modelli (*raft* lipidici) che degli oligomeri proteici formati nell'interazione.

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza della composizione di fase di monostrati composti da miscele di differenti lipidi, con particolare riferimento alla formazione di *rafts*. Pubblicazioni scientifiche.

Conoscenze sulla struttura di doppistrati (liposomi) composti da miscele di differenti lipidi, con particolare riferimento alla formazione di *rafts*. Pubblicazioni scientifiche.

Conoscenza degli effetti indotti dalla presenza di molecole con azione farmacologia (proteine, farmaci e DNA) sulla struttura di fase dei monostrati, con particolare riferimento all'aggregazione proteica. Pubblicazioni scientifiche.

Conoscenza degli effetti indotti dalla presenza di molecole con azione farmacologia (proteine, farmaci e DNA) sulla struttura di fase dei doppistrati (liposomi), con particolare riferimento all'aggregazione proteica. Pubblicazioni scientifiche.

Trasferibilità dei risultati

Possibile sviluppo di molecole capaci di controllare e prevenire lo scorretto piegamento e la scorretta interazione di proteine interagenti con membrane cellulari e coinvolte con malattie amiloidose (Alzheimer, Parkinson, Creutzfeld-Jacob) o di controllare e ridurre il fenomeno della polifarmacoresistenza in chemioterapia.

Preparazione e ottimizzazione di sistemi per il trasporto (liposomi, *lipoplexy*) e il rilascio controllato di molecole ad azione farmacologica (porfirine, calcitonina, DNA).

Studio di terapie innovative per il trattamento di tumori umani farmacoresistenti

Alcuni tumori possono presentare, sia *in vitro* che *in vivo*, una scarsa sensibilità agli agenti chemioterapici risultando, quindi, difficilmente aggredibili con i tradizionali trattamenti farmacologici. Uno dei principali obiettivi della ricerca oncologica è perciò quello di individuare nuove strategie terapeutiche efficaci nei confronti dei tumori farmacoresistenti.

Sulla base dei risultati ottenuti negli anni preceenti, ci si propone di continuare gli studi su due modelli sperimentali: a) l'impiego dell'aminossidasi da siero bovino per il trattamento del melanoma, b) ottimizzazione della terapia fotodinamica per il trattamento del glioblastoma.

Il razionale del primo modello si basa sul fatto che le cellule tumorali presentano un elevato contenuto di poliamine e che l'enzima aminossidasi è in grado di catalizzare la deaminazione ossidativa delle poliamine, quale la spermina, con formazione di prodotti citotossici (H₂O₂ e aldeidi). Gli studi da noi finora condotti hanno fornito un risultato particolarmente interessante: le linee cellulari resistenti, comprese quelle di melanoma umano, si sono rivelate più sensibili all'effetto citotossico dei suddetti prodotti rispetto alle corrispondenti linee parentali. Per quanto riguarda il secondo modello, è noto che il fallimento della terapia del glioma maligno è essenzialmente dovuto alla bassa tollerabilità del tessuto cerebrale alle radiazioni ionizzanti, alla presenza della barriera emato-encefalica e alla comparsa di isole tumorali all'interno del tessuto normale, anche dopo la rimozione chirurgica del tumore. Da alcuni anni, la terapia fotodinamica sta offrendo promettenti prospettive nella terapia di questo tumore. Tuttavia, rimangono ancora numerosi problemi da risolvere, soprattutto relativi al *delivery* dell'agente fotosensibilizzante e al suo *uptake* da parte delle cellule tumorali.

Risultati attesi nel triennio

Relativamente alla prima linea di ricerca, si tenterà in una prima fase di confrontare l'effetto citotossico dei prodotti di ossidazione enzimatica della spermina su linee cellulari tumorali di diverso istotipo e che presentano diversi livelli di farmacoresistenza. I trattamenti verranno eseguiti sia in normotermia che a 42° C allo scopo di verificare l'eventuale effetto potenziante dell'ipertermia. Successivamente si tenterà di confermare l'effetto citotossico selettivo dei

prodotti di ossidazione nei confronti dei tumori resistenti, utilizzando modelli tumorali animali. Gli obiettivi di questa ricerca saranno quelli di individuare le migliori condizioni di trattamento su linee cellulari di melanoma umano con diverso grado di resistenza e, sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, di verificare l'efficacia della somministrazione dell'aminossidasi di siero bovino ad animali in cui sono state impiantate cellule di melanoma.

Scopo della ricerca sul glioblastoma sarà quello di individuare le migliori condizioni di trasferimento dell'agente fotosensibilizzante all'interno delle cellule tumorali impiegando come carrier liposomi di diversa composizione. L'efficacia del trasferimento verrà valutata sia determinando la concentrazione intracellulare del fotosensibilizzante impiegando diverse linee cellulari di glioblastoma, sia determinando la citotossicità indotta, prima e dopo l'irraggiamento con luce *laser* di diversa potenza e lunghezza d'onda.

Trasferibilità dei risultati

In considerazione dei promettenti risultati finora ottenuti, è ragionevole supporre che quelli che si potranno ottenere nel prossimo triennio nell'ambito di questo progetto potranno fornire utili indicazioni per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative dirette contro i tumori farmacoresistenti. Infatti, il primo obiettivo prevede l'impiego di una sostanza naturale, quale l'aminossidasi bovina, che se confermerà la sua efficacia su tumori sperimentali animali e se non presenterà seri problemi di *delivery*, potrà rapidamente essere trasferita alla pratica clinica. Il raggiungimento del secondo obiettivo potrà contribuire all'ottimizzazione della terapia fotodinamica, già impiegata in clinica contro il glioma maligno, pur se ancora con modesti risultati.

Studio ultrastrutturale dei meccanismi di farmacoresistenza in microorganismi patogeni

Le infezioni fungine opportunistiche rappresentano una importante causa di morbilità e mortalità nei pazienti immunocompromessi. Tutto ciò ha reso necessario concentrare gli sforzi sullo sviluppo di nuovi farmaci, quali le echinocandine (es. micafungin). Questi farmaci esercitano un'azione citolitica; sono in grado di alterare la corretta sintesi della parete cellulare bloccando l'enzima b-1,3 glucanasi. Molte delle funzioni biologiche correlate alla patogenicità e alla virulenza di *C. albicans* risiedono nella parete cellulare che, essendo la struttura più esterna del fungo, è critica per la morfogenesi fungina e è responsabile dell'interazione ospite-fungo. In presenza di farmaci si assiste a un cambiamento nella composizione delle principali proteine legate al glucano (GAP) della parete cellulare. Numerosi dati della letteratura dimostrano il ruolo del glutatione (GSH, principale antiossidante intracellulare) nei meccanismi di detossificazione da farmaci e nell'acquisizione di farmacoresistenza nelle cellule eucariotiche. Dal punto di vista della virulenza, studi eseguiti *in vivo* hanno inoltre messo in evidenza che i ceppi resistenti mostrano un aumento della virulenza quando inoculati intraperitonealmente in animali da esperimento. Si è quindi ipotizzato che le modificazioni della parete cellulare e in particolare le proteine parietali come la b-1,3 glucanasi possano essere coinvolte nei meccanismi di resistenza e/o virulenza in *C. albicans*.

Risultati attesi nel triennio

1- Definizione del ruolo esercitato dalle proteine parietali legate covalentemente al glucano (b-1,3 glucanasi) e delle eventuali modificazioni indotte in esse da farmaci nella fisiologia del microorganismo e nell'acquisizione della resistenza. Tale studio verrà condotto impiegando essenzialmente tecniche di microscopia elettronica per rivelare i cambiamenti morfologici e ultrastrutturali della parete cellulare pre e post-trattamento antimicotico dei ceppi a diverso grado di resistenza. In particolare, verranno eseguite immunomarcature mediante la tecnica della crioultramicrotomia al fine di localizzare la distribuzione delle proteine parietali.

2- Studio riguardante eventuali variazioni dello stato *redox* in risposta a farmaci antifungini e eventuali correlazioni con la sensibilità/resistenza ad essi e la presenza o meno di fenomeni apoptotici. In particolare, non è a tutt'oggi noto il ruolo del GSH, importante nei meccanismi di detossificazione da farmaci e nei meccanismi di resistenza di *Candida* agli agenti antifungini. Questo studio verrà condotto mediante citometria a flusso.

3- Analisi della variazione dell'efficacia dei farmaci anti-fungini nei confronti dei ceppi di *Candida* in modelli sperimentali *in vivo*. In particolare verranno impiegati un modello di candidiasi vaginale nella ratte e un modello di candidiasi sistemica nel topo.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio potrà contribuire a chiarire i meccanismi subcellulari e molecolari alla base del fenomeno della farmacoresistenza che spesso insorge, spontaneamente o in seguito al trattamento farmacologico, nel corso delle infezioni micotiche.

I risultati ottenuti potranno essere trasferiti nella pratica clinica poiché il modello sperimentale si propone di studiare, sia *in vitro* e sia su modelli animali, nuove modalità di trattamento basate su associazioni di farmaci in grado di superare la farmacoresistenza utilizzando sostanze già di uso corrente.

Sviluppo di metodologie per il *technology assessment* nelle tecnologie mediche che utilizzano le radiazioni ionizzanti

La valutazione tecnologica in campo sanitario, che consiste nella valutazione del trasferimento delle tecnologie sanitarie nella pratica clinica, ha implicazioni non solo cliniche ma anche organizzative, economiche e sociali. Le scienze radiologiche comportano l'uso di tecnologie tra le più complesse oggi disponibili in campo sanitario, l'uso di radiazioni e una richiesta molto elevata da parte del cittadino. Si rende pertanto necessario un'attenta valutazione dell'utilizzo delle tecnologie ad esse connesse. Tra queste tecnologie quelle che comportano l'uso di radiazioni ionizzanti, in particolare radioterapia e radiodiagnostica, necessitano di ancora più attente considerazioni in relazione al rapporto rischio/beneficio. Inoltre, nella valutazione dell'efficacia e appropriatezza di tecnologie diagnostico/terapeutiche complesse la ricerca clinica gioca un ruolo di primo piano. In particolare, la normativa vigente prevede che i programmi di ricerca medica, intesa come "indagine sistematica nel campo della salute volta a sviluppare la conoscenza e la pratica medica che comporta esposizione a radiazioni ionizzanti in volontari" venga sottoposta a valutazione da parte di un comitato etico.

In accordo con i principi generali della valutazione tecnologica è necessario che gruppi di lavoro multidisciplinari procedano con un'attività di elaborazione di linee guida, che considerino sia gli aspetti tecnici dei trattamenti radioterapici e delle indagini diagnostiche che quelli correlati agli aspetti etici delle sperimentazioni cliniche, rispetto alle quali i Centri operanti sul territorio nazionale possano confrontarsi. Poiché la Commissione Europea sta elaborando linee guida sugli *audit* clinici radiologici che si basano sulle esperienze maturate a livello nazionale, una prima valutazione del livello di recepimento delle indicazioni fornite potrebbe rivelarsi importante.

Risultati attesi nel triennio

Un possibile esempio metodologia per il *technology assessment* è l'uso degli indicatori come strumenti per valutare la qualità e l'appropriatezza dell'uso delle radiazioni in campo medico. Gli indicatori di autovalutazione costituiscono uno strumento per monitorare, nel contesto di programmi di miglioramento continuo della qualità le prestazioni e le caratteristiche di un Centro nel corso di singoli progetti di accreditamento o di *audit* clinici. Gli *audit* clinici e dosimetrici devono fornire ai partecipanti l'opportunità di introdurre, nella logica del miglioramento continuativo, fattori correttivi necessari per raggiungere e mantenere un livello

adeguato di qualità, secondo quanto indicato dalle principali organizzazioni internazionali. Come risultati dell'implementazione degli indicatori di autovalutazione nella pratica clinica ci si aspetta di ottimizzare la pianificazione dei trattamenti e delle indagini diagnostiche mirando a obiettivi sempre più importanti, entrando nello specifico delle patologie. Un altro esempio di sviluppo di metodologie per il *technology assessment* è l'identificazione di strumenti per il monitoraggio del movimento degli organi durante i trattamenti radioterapici. Il movimento degli organi con lo sviluppo di tecnologie sempre più avanzate, come la radioterapia ad intensità modulata che prevedono l'uso di dosi elevate solo sul bersaglio, diventa un problema stringente per la conservazione degli organi critici. Un altro esempio è la valutazione della potenzialità delle tecniche di *imaging* nella definizione della risposta alla terapia e quali debbano essere i parametri che evidenziano più facilmente la risposta, permettendo al contempo di discriminare effetti dannosi indesiderati della radioterapia stessa dalle recidive tumorali.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità di questo tipo di ricerca si basa essenzialmente sull'elaborazione di documenti che sono poi utilizzati direttamente dai Centri che fanno uso di radiazioni in campo medico e dalle Regioni per mettere a punto *audit* clinici e dosimetrici nella logica del miglioramento continuo della qualità. Questi documenti che vanno da lavori su riviste internazionali a rapporti tecnici a manuali di qualità e a linee guida hanno l'obiettivo di mettere i Centri italiani di radioterapia e radiodiagnostica nelle condizioni di rispondere ai requisiti della normativa nazionale vigente e di confrontarsi e rispondere alle indicazioni provenienti dalle principali Associazioni Internazionali del settore.

Sviluppo di tecniche spettroscopiche (ottiche e RMN) in fisica biomedica

Il controllo locale del tumore primario è il prerequisito fondamentale per la cura dei pazienti affetti da tumore sia per impedire la progressione del tumore che lo sviluppo di metastasi a distanza. La radioterapia è tra le più efficaci forme di trattamento locoregionale dei tumori, collocandosi al secondo posto dopo il trattamento chirurgico.

I trattamenti radioterapici oggi vengono effettuati o con fotoni o con particelle (protoni, neutroni, pioni, ioni leggeri o pesanti). La radioterapia si avvale sia dei risultati provenienti dalla ricerca tecnologica, sia del contributo di conoscenze derivanti dallo studio di sistemi di varia complessità per la comprensione del danno cellulare. Nonostante il grosso sforzo di ricerca in questi campi, a causa della sua complessità rimane di non facile soluzione il problema fondamentale di impartire il massimo danno al tessuto patologico con minime conseguenze sul tessuto sano.

Gli obiettivi che ci siamo proposti in questo ambito sono relativi da un lato al miglioramento delle conoscenze relative alla radiosensibilità cellulare, mirate all'individuazione di indicatori predittivi, e dall'altro allo sviluppo di nuove tecnologie che permettano di valutare le distribuzioni di dose somministrate nei piani di trattamento radioterapico.

a Sviluppi metodologici nelle applicazioni della Risonanza Magnetica

In oncologia lo scopo della radioterapia è quello di somministrare una dose di radiazioni a un definito volume tumorale con il minor danno possibile ai tessuti sani, in modo da eradicare il tumore permettendo al contempo una buona qualità di vita e il prolungamento della sopravvivenza. Secondo le più recenti indicazioni si tende ad irraggiare quello che è stato definito il volume clinico radioterapeutico (CTV) per l'ottimizzazione del trattamento. Sono dunque sempre più necessarie informazioni sui siti in cui si stanno sviluppando cellule tumorali, sulla loro radiosensibilità, e sull'eventuale instaurarsi di radioresistenza. Per lo studio della radiosensibilità cellulare è importante poter disporre di indicatori metabolici che permettano di comprendere gli effetti del trattamento.

La spettroscopia di Risonanza Magnetica (MRS) viene sempre più utilizzata, in connessione con la MRI, per indirizzare le terapie sulla base di una migliore conoscenza degli aspetti fisiopatologici della malattia. Per quanto riguarda le applicazioni allo studio dei tumori la MRS, anche nell'approccio multinucleare, è in grado di fornire informazioni sulla biochimica e il metabolismo delle cellule tumorali nel tessuto in esame. Gli sviluppi di questa tecnica possono fornire elementi utilizzabili per la classificazione dell'aggressività del tumore o per comprendere se i trattamenti terapeutici siano efficaci, soprattutto nel caso di chemio o radioresistenza. In particolare le tecniche di analisi multivariata dei parametri spettrali e dell'andamento dei metaboliti ha dimostrato di poter descrivere o identificare stati metabolici caratterizzati da un alto livello di complessità. Le potenzialità di questa tecnica possono essere ulteriormente amplificate avvalendosi dei più recenti sviluppi sperimentali quali l'uso di campi ad altissima frequenza e l'uso di gradienti di campo che permettono di effettuare esperimenti avanzati di spettroscopia bidimensionale. È in tal modo possibile mettere a punto nuovi assetti sperimentali che permettono di rivelare e quantificare anche segnali deboli oscurati dalla presenza di segnali vicini più intensi, in particolare del segnale dell'acqua, che costituisce la difficoltà maggiore nel caso delle applicazioni a cellule e tessuti. Inoltre, ci si avvarrà delle tecniche avanzate di analisi del segnale, per la determinazione dei parametri spettrali da cui ricavare le concentrazioni delle specie di interesse.

b Sviluppo di nuove tecniche dosimetriche in 2D e 3D

La moderna radioterapia richiede una particolare attenzione alla verifica della distribuzione di dose in tre dimensioni con alta risoluzione spaziale. Vogliamo sottolineare l'interesse che stanno suscitando da alcuni anni i dosimetri composti da gel tessuto-equivalente. Questi sistemi permettono, almeno in linea di principio, la rivelazione della distribuzione di dose in tre dimensioni. L'aumento della dose locale con alti gradienti di dose, la complessità degli algoritmi di pianificazione inversa e dei calcoli di dose e le tecniche di erogazione della dose nella IMRT richiedono una particolare attenzione all'assicurazione di qualità del piano di trattamento. A questo scopo potrebbero rispondere molto bene i gel, che constano essenzialmente di due classi principali. La prima basata su sistemi gel che polimerizzano per effetto della radiazione; la seconda basata sull'ossidazione del ferro da ione ferroso a ione ferrico prodotta dalla radiazione (dosimetro di Fricke), in cui il sistema gel fornisce la matrice tridimensionale che rende il sistema stabile spazialmente. I sistemi di rivelazione per questi tipi di dosimetro sono due: la rivelazione con la misura dei tempi di rilassamento di RMN e la densitometria ottica. Studi recenti hanno messo in luce l'interesse per le possibili applicazioni del gel-Fricke in considerazione della sua facilità di preparazione rispetto all'altro tipo di gel, della possibilità di modificarne la composizione per renderlo equivalente a tessuti diversi e della sua modellabilità per renderlo simile a strutture anatomiche.

In particolare, le principali caratteristiche a cui potrebbero far fronte questi dosimetri sono:

alta risoluzione spaziale

possibilità di misurare un gran numero di punti contemporaneamente

misure eseguibili in tre dimensioni

rapidità e facilità della misura

costo contenuto

Risultati attesi nel triennio

Verranno sviluppati modelli per la comprensione delle variazioni di segnali, derivanti da lipidi mobili (ML), in accordo con le variazioni di equilibrio fra produzione e consumo della specie osservata nelle diverse fasi del ciclo cellulare, da mettere in relazione ai blocchi proliferativi indotti dalle radiazioni. Verrà inoltre studiata la modulazione con la proliferazione dei segnali relativi agli antiossidanti, quali il glutatione (GSH). La determinazione della concentrazione del GSH mediante la MRS è una modalità non distruttiva, attuabile direttamente

sulla cellula *in toto*. Il segnale studiato è rilevabile anche in vivo. Infine saranno utilizzate tecniche di analisi multivariata per correlare le osservazioni spettrali allo stato di proliferazione o di arresto nella crescita cellulare in seguito a trattamenti con radiazioni.

Per quanto riguarda gli sviluppi dei sistemi dosimetrici l'attività è volta a ricostruire la distribuzione di dose 3D utilizzando un fantoccio Fricke-gel-xilenol *orange* tramite misure di assorbimento ottico basate su di una rivelazione con camera CCD. Si ottengono le proiezioni 2D e tramite il metodo della *back-projecton* la ricostruzione 3D. L'attività comporta la costruzione di un preprototipo con il necessario sviluppo strumentale e di analisi dell'immagine per la ricostruzione 3D (è inclusa in un progetto della CE (MAESTRO)). Come pre-prototipo per ottenere la distribuzione di dose tridimensionale si sta modificando un microdensitometro, originariamente costituito da una *light-box* monocromatica funzionante a 660 nm e da una telecamera CCD, tradizionalmente dedicata alle misure di densità ottica su film GafCromici, e qui impiegata per la prima volta con un gel radiocromico. Parallelamente si stanno esaminando le caratteristiche di precisione e accuratezza fornite da diverse soluzioni di Fricke-agarosio.

Questa prospettiva appare particolarmente allettante, sia perché potrebbe garantire bassi costi e grande facilità d'impiego, sia perché il tempo d'acquisizione e la risoluzione spaziale potrebbero essere già intrinsecamente idonei a garantire buoni risultati.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a congresso

Sviluppo e realizzazione di un rivelatore a gas di fotoni ottici per TOF-PET

Il reparto di Fisica e Tecnologie Nucleari per la Salute è impegnato nello studio della struttura del nucleo e dei suoi componenti - i nucleoni, attraverso esperimenti di fisica sub-nucleare di rilevanza internazionale.

I componenti del reparto hanno ruoli guida nella progettazione e realizzazione dei complessi apparati sperimentali e nella presa e analisi dei dati raccolti.

Questa attività, principalmente finanziata dall'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, di per se interessante, è di importanza fondamentale per l'acquisizione di *know-how* nel campo dei rivelatori di particelle e nelle tecniche avanzate di analisi dei dati, entrambi poi impiegati nella realizzazione di strumentazione innovativa per la medicina nucleare.

In questo ambito si colloca il presente progetto, che ha il proposito di realizzare nei prossimi anni un rivelatore a gas sensibile ai fotoni nel visibile (oltre che nell'ultravioletto) basato sulle proprietà di fotoconversione di un sottile deposito di ossido di cesio ($CsI + Cs + O_2$), e la successiva raccolta della carica emessa per mezzo di camera in regime proporzionale, che forma parte integrante con il substrato su cui il CsO è depositato.

Tale rivelatore potrà essere impiegato in un sistema prototipo per TOF-PET (*Positron Emission Tomography* - con misura del tempo di volo) che utilizza un cristallo scintillante veloce (come il BaF, la cui piccola componente veloce cade nell'ultravioletto mentre quella lenta, più consistente, è prevalentemente nel visibile).

Il sistema TOF-PET avrebbe notevoli vantaggi rispetto ai sistemi attualmente in uso negli Ospedali e Laboratori di ricerca in termini di "risoluzione di volume" e rapporto segnale rumore, parametri essenziali per molte applicazioni, grazie alla migliore localizzazione del punto di emissione dei due fotoni di annichilazione del positrone. Il costo del fotorivelatore, determinato in parte dall'uso delle camere proporzionali, sarebbe inoltre notevolmente inferiore a quelli utilizzati in altri sistemi.

Gran parte del *know-how* e dell'apparecchiatura richiesti è stato acquisito nei precedenti anni, nella realizzazione di un sofisticato rivelatore Cherenkov a immagine anulare (RICH) utilizzato in esperimenti di fisica sub-nucleare per l'identificazione di adroni.

Risultati attesi nel triennio

In linea di massima, il piano di progetto si articola come segue:

Nel primo anno si intende perfezionare la tecnica di deposizione (in camera a vuoto molto spinto) del CsI+Cs+O₂ su piani che fungono da fotorivelatore e di misurarne l'efficacia nella rivelazione dei fotoni ottici.

Nell'anno successivo si procederà alla messa a punto della camera proporzionale e accoppiamento con materiale scintillante, anche attraverso simulazione MonteCarlo.

Nell'ultimo anno si provvederà alla finalizzazione di un prototipo TOF-PET, con l'alloggiamento (anche parziale) degli elementi di rivelazione, alla realizzazione dei processori *software* di acquisizione e analisi delle immagini, nonché al *test* in laboratorio (e possibilmente in clinica) del sistema.

Naturalmente questa attività procederà in parallelo all'attività di ricerca fondamentale ricordata sopra, dove il reparto ha responsabilità di (co)leadership e che prevede nei prossimi tre anni, l'analisi dei dati degli esperimenti in corso e nella definizione di nuovi esperimenti e eventuali apparati sperimentali.

Trasferibilità dei risultati

La PET è di notevole importanza, sia per la diagnostica medica umana che per la ricerca biologica e medica su piccoli animali. Questi sono i principali campi applicativi del sistema sperimentale TOF-PET che si intende realizzare.

Inoltre, il rivelatore a gas dei fotoni ottici può trovare impiego nelle altre applicazioni di medicina nucleare con radionuclidi, dove è richiesta la rivelazione di fotoni.

TASSVCP (Tecniche avanzate per lo studio strutturale di protesi cardiache valvolari)

Negli ultimi anni si sono verificati numerosi eventi avversi per i portatori di protesi cardiache valvolari riconducibili a problematiche strutturali sia nel caso di protesi meccaniche che in tessuto biologico. Le analisi svolte in ISS hanno messo in luce la necessità di metodi veloci e efficaci per l'identificazione delle cause che portano a disfunzione strutturale l'impianto di valvola cardiaca.

A tal fine vengono proposti i seguenti argomenti di studio.

Realizzazione di una stazione polarimetrica per il tessuto biologico di origine animale (protesi in pericardio bovino o porcino). Tale apparato consentirà una valutazione non invasiva del mantenimento della struttura delle fibre di collagene per l'impiego prolungato *in vivo* o per patologia (ad es., infettiva) con effetti sulla struttura valvolare.

Messa a punto di una tecnica avanzata di indagine strutturale per protesi cardiache valvolari meccaniche. Tale tecnica si inquadra nel settore della NDT (*non-destructive testing*), ed è in particolare incentrata sulla diagnosi fotoacustica dei materiali delle protesi. Mediante l'analisi del segnale ultrasonoro emesso dal materiale sotto esame, in conseguenza di impulsi *laser* energetici, si intende quantificare le caratteristiche di eventuali difetti strutturali presenti nella protesi, realizzando una tomografia del dispositivo. Tale indagine si rende necessaria, vista l'incidenza frequente (vedi statistiche Maude-FDA) di incidenti.

Realizzazione di esperimenti di termografia differenziale al fine di individuare rapidamente i punti critici di un progetto di valvola cardiaca meccanica. L'alta sensibilità di questa tecnica (ad es., industria aeronautica e automobilistica) permette il suo impiego nell'ambito della caratterizzazione dei dispositivi medici.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca fornirà indicazioni di protocollo sperimentale, validazione o dei risultati, indicazione di risultati tipici in forma di ATLAS per le caratterizzazioni di tipo strutturale non

distruttivo impiegate; queste sono essenziali per l'analisi di campioni di protesi da non sottoporre a cambiamenti (ragioni di contenzioso legale) nelle attività istituzionali, così come pure nell'ambito delle ricerche sperimentali allo stato dell'arte, volte alla riduzione degli eventi di tipo improvviso e catastrofico. La ricerca permetterà di rendere disponibili nuove strumentazioni realizzate in ISS con le quali fornire indicazioni e protocolli alla comunità scientifica di riferimento nonché dati di validazione e confronto, e prove comparative su dispositivi. Queste ultime forniranno indicazioni anche per la validazione di nuove metodiche di indagine sul paziente.

Possibilità di impiego nelle attività istituzionali di controllo.

Risultati utili per i progettisti di nuovi dispositivi.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di nuove strumentazioni realizzate in ISS e dati di validazione e confronto, prove comparative su dispositivi per validazione delle metodiche.

Possibilità di impiego nelle attività istituzionali di controllo.

Risultati utili per i progettisti di nuovi dispositivi.

Technology assessment di strumentazione per baropodometria

Le indagini baropodometriche per la valutazione dell'appoggio plantare durante la locomozione sono parte importante della diagnostica ospedaliera (tanto da essere previste e rimborsate dal Servizio Sanitario Nazionale), e hanno ampia diffusione presso laboratori di ricerca e ricerca applicata, e ambienti di progettazione, realizzazione e validazione di ortesi plantari (anche queste ultime prescrivibili e rimborsabili dal Sistema Sanitario Nazionale sulla base del Nomenclatore Tariffario). L'approssimazione e la scarsa affidabilità della strumentazione commerciale reperibile sul mercato nazionale e internazionale, e la necessità di standardizzazione dei parametri estraibili, rendono necessario uno studio rigoroso e quanto più ampio possibile delle reali caratteristiche tecniche degli strumenti in commercio, del degrado delle stesse a seguito di usura e cattiva manutenzione, della possibilità di messa a punto di dispositivi di test utilizzabili anche "sul campo".

Risultati attesi nel triennio

Standardizzazione di criteri e metodi di test di strumenti per baropodometria. Identificazione delle caratteristiche tecniche e delle prestazioni delle più diffuse soluzioni commerciali attualmente sul mercato. Progettazione e validazione di strumenti e metodi per periodici test "sul campo".

Trasferibilità dei risultati

Produzione di *report* comparativi sulle caratteristiche tecniche e sulle prestazioni delle soluzioni commerciali per baropodometria attualmente sul mercato. Produzione di linee guida per la verifica periodica delle stesse "sul campo".

Tecniche di misura e valutazione dell'esposizione alla radioattività naturale in Italia

Le attività si articolano come segue:

A) Sviluppo e caratterizzazione di alcune tecniche di misura per la misura della concentrazione di radon e toron, e del rateo di dose assorbita in aria da radiazione gamma. Verranno presi in esame diversi rivelatori a tracce largamente utilizzati per la misura della concentrazione di radon ma spesso non adeguatamente caratterizzati, e alcuni rivelatori per la misura della concentrazione di toron.

B) Valutazione dell'esposizione alla radioattività naturale, in particolare al radon e alla radiazione gamma emessa dal suolo e dai muri degli edifici. In particolare: 1) verrà proseguito lo studio sperimentale sulle variazioni annuali della concentrazione di radon in un campione di abitazioni di Roma, con un potenziale notevole impatto sulle stime di rischio e sulle normative in materia. Questo studio, iniziato 10 anni fa, costituisce un data set unico sulle variazioni a lungo termine della concentrazione di radon; 2) verranno analizzati i dati dei questionari contenenti informazioni sulle caratteristiche costruttive delle abitazioni del Lazio in cui è stata misurata la concentrazione di radon; 3) verrà proseguito il progetto, in collaborazione con la Telecom-Italia, finalizzato ad effettuare una mappatura della concentrazione di radon nel sottosuolo, correlandola con la concentrazione di radon negli edifici; ii) una mappatura del rateo di dose gamma all'aperto, correlandola con il rateo di dose gamma all'interno degli edifici.

Risultati attesi nel triennio

A1) Messa a punto di una camera per irraggiare rivelatori con particelle alfa di energia e angolo di incidenza controllati; A2) messa a punto di una camera radon (in collaborazione con l'Istituto Nazionale di Metrologia delle Radiazioni Ionizzanti) da 1 m³ per esposizioni controllate ad atmosfere di radon; A3) Messa a punto di strumentazione per la misura della concentrazione di radon valutando la curva di risposta (anche ad alte esposizioni) di diversi rivelatori in diverse camerette di diffusione. A4) Sviluppo di un dispositivo elettronico per l'analisi temporale dei segnali emessi da celle a scintillazione per la misurazione della concentrazione in aria di toron. A5) Studio della distribuzione spaziale di toron in alcuni locali, tramite rivelatori attivi e passivi.

B1) Determinazione sperimentale delle variazioni temporali (stagionali e annuali) della concentrazione di radon nelle abitazioni, e analisi del loro impatto sulle stime di rischio e sulle normative in materia. B2) Analisi dei fattori che influenzano la concentrazione di radon presente nelle abitazioni del Lazio e mappatura della concentrazione di radon nelle abitazioni del Lazio, e in particolare di Roma. B3) Mappatura della concentrazione di radon nel sottosuolo dei centri abitati delle regioni italiane e correlazione con la concentrazione di radon negli edifici. Mappatura dell'esposizione alla radiazione gamma *outdoor* nei centri abitati e correlazione con i valori all'interno degli edifici.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche

Comunicazioni a convegni

Normative e linee-guida nel settore della radioprotezione e delle tecniche di misura, incluso norme UNI

Tecniche dinamiche di diagnostica e monitoraggio funzionale della retina

Le ricerche svolte nel passato periodo di attività (linea di ricerca ISS: Metodi avanzati di diagnosi e terapia delle patologie della retina) hanno dimostrato la possibilità di eseguire un monitoraggio elettrofisiologico della funzione maculare durante applicazioni di terapia *laser* termica in soggetti affetti da maculopatia senile. Il metodo, basato su precedenti risultati e apparecchiature originali sviluppate nel Dipartimento, è potenzialmente utilizzabile in altri contesti di intervento terapeutico e chirurgico, grazie alla semplicità e efficacia della stimolazione visiva utilizzata e alla ridotta latenza con cui viene elaborato il segnale elettrofisiologico. La risposta funzionale viene trattata con criteri statistici e tradotta in termini di un semplice livello dinamico, il che consente di controllare l'evoluzione dell'intervento, contribuendo alla sua corretta esecuzione.

Il presente progetto si propone quindi di sviluppare il metodo del monitoraggio elettrofisiologico sia nella parte strumentale che nei protocolli di applicazione. Lo sviluppo

degli strumenti per la stimolazione visiva di tipo *flicker* e per l'acquisizione ed elaborazione dei segnali elettroretinografici potrà avvenire con i mezzi tecnici già presenti nel Dipartimento. L'applicazione clinica avverrà presso il Dipartimento di Oftalmologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore.

Risultati attesi nel triennio

Un primo campo di applicazione potrà essere quello del trattamento *laser* della retinopatia del prematuro. In questo caso il monitoraggio intraoperatorio, che non è stato finora sperimentato, sarebbe di particolare importanza. Inoltre la verifica degli esiti dell'intervento può avvenire in questo caso solo con metodi obiettivi. Altro campo di applicazione è quello generale della neurochirurgia, ove siano interessate le vie visive. Questa situazione si presenta ad esempio negli interventi di rimozione di masse tumorali, in cui il metodo di monitoraggio proposto può servire ad evitare lesioni al tessuto funzionale.

In generale i metodi proposti rendono più semplici, rapide e affidabili le tecniche diagnostiche di elettrofisiologia della visione, e possono quindi essere utilmente impiegate anche nella diagnostica oculistica generale, ove hanno tuttora una diffusione assai limitata.

Trasferibilità dei risultati

I risultati della ricerca si potranno concretizzare in protocolli diagnostici e di monitoraggio basati su metodi di acquisizione ed elaborazione di segnali elettrofisiologici. Allo scopo verranno sviluppati programmi e strumenti elettronici che potranno essere oggetto di trasferimento tecnologico, anche per mezzo di brevetti. La sperimentazione e la trasferibilità in campo clinico è inizialmente garantita dalla collaborazione in atto e potrà essere facilmente estesa nell'ambito di istituti di ricerca in contatto con il gruppo proponente. Data la generalità e ampia applicabilità dei metodi considerati è ipotizzabile una più ampia diffusione a livello del Servizio Sanitario Nazionale. I risultati scientifici verranno diffusi anche nell'ambito dell'attività didattica dell'Università Cattolica, a livello dei corsi di aggiornamento per oculisti.

Tecniche innovative ibride per la determinazione di indici di rischio nel caso di impianto di dispositivi medici nel sistema cardiocircolatorio

L'impianto di dispositivi medici relativi al sistema cardiocircolatorio, quali valvole cardiache meccaniche e di origine animale e stent vascolari, e di sistemi di assistenza meccanica al circolo (pompe centrifughe e assiali e cateteri), rappresenta oggi un mezzo terapeutico di larghissimo uso per permette il trattamento delle patologie cardiovascolari e un miglioramento, a breve e medio termine, evidente del quadro clinico del paziente. Tuttavia tali dispositivi protesici possono modificare le normali condizioni fisiologiche del flusso ematico che comportano trattamento terapeutico non ottimo se non dannoso. Il rischio associato può essere predetto con metodiche innovative facendo un uso integrato di tecniche già sperimentate. Il rischio può essere esplicitato come problemi a carico della parte corpuscolata del sangue e della parete dei vasi sanguigni, ad esempio innesco di fenomeni di iperplasia dell'intima o emolisi e trombogenesi, o inefficienza protesica (*Effective Orifice Area -EOA-* nel caso valvolare, disadattamento di impedenza nel caso endovascolare). Per predire il rischio è fondamentale sviluppare indici e parametri che possano fornire indicazioni predittive dei possibili danni associati all'impiego di dispositivi protesici sulla base delle loro caratteristiche e della patologia associata.

A tal fine è possibile ricorrere all'implementazione di tecniche ibride, in grado cioè di poter coniugare studi di tipo sperimentale e numerico, definendo set-up sperimentali specifici e impiegando codici di calcolo dedicati: saranno impiegate collaborazioni con l'Università di Ancona e il Politecnico di Milano, Università di Padova, ASL di Treviso.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca proposta permetterà di valutare una vasta classe di dispositivi medici ampiamente utilizzati nella pratica clinica fornendo così una casistica esauriente sui vantaggi e gli svantaggi associati a tali dispositivi. Saranno valutati aspetti e parametri fondamentali quali l'EOA, come indice del livello di perfusione di una valvola cardiaca protesica attraverso l'integrazione di modelli numerico-sperimentali, l'alterazione dello *shear stress* sulla parete di vasi sanguigni a seguito dell'impianto di stent endovascolari per poter prevedere eventuali fenomeni di restenosi, il danno emolitico prodotto da dispositivi meccanici di assistenza al circolo (pompe e cateteri). I risultati attesi avranno una rilevante implicazione in ambito medico perché rappresenteranno una base concreta sulla quale fondare approcci critici sulla validità di un determinato trattamento terapeutico.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti potranno essere facilmente e direttamente impiegati in ambiente clinico perché sviluppati in formato di utile consultazione per i clinici.

Allo stesso tempo tali indici potranno essere di notevole interesse per i progettisti di dispositivi medici in modo da minimizzare i rischi inevitabilmente associati con l'uso di protesi.

Un modello di valutazione domiciliare per pazienti post evento cardiovascolare acuto mediante telemonitoraggio di parametri cardiovascolari

I più recenti dati di letteratura evidenziano l'importanza del controllo di parametri cardiovascolari e metabolici (pressione arteriosa, frequenza cardiaca e glicemia) al fine di ridurre la probabilità di eventi acuti (infarto e *ictus*). La tecnologia dei dispositivi medici attuali mette a disposizione di parte della popolazione metodi di automisura di parametri di interesse cardiovascolare, utili a delineare un quadro complessivo dello stato di salute e una stima del rischio di eventi acuti. Tuttavia molteplici fattori possono limitare la fruibilità di questi strumenti in particolari tipologie di pazienti. Ciò riguarda in particolare il paziente "debole", paziente che per ragioni socio-economiche o culturali non è in grado di seguire autonomamente un percorso terapeutico e assistenziale appropriato.

La tecnologia dei dispositivi medici attuali mette a disposizione di parte della popolazione metodi di automisura di parametri di interesse cardiovascolare, utili a delineare un quadro complessivo dello stato di salute e una stima del rischio di eventi acuti. 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

Proporre un modello di gestione domiciliare del paziente, basato su una integrazione di tecnologie esistenti, finalizzato a garantire una continuità assistenziale dopo dimissione dalla struttura specialistica, mantenendo un collegamento costante con la struttura stessa. Tale collegamento è rappresentato dalla trasmissione automatica tramite rete cellulare delle automisurazioni che periodicamente il paziente è tenuto a fare.

Obiettivi principali sono: la valutazione della accettabilità e utilizzabilità da parte del paziente e delle strutture sanitarie del modello proposto; la valutazione del grado di aiuto necessario e della efficacia del supporto dei familiari o di strutture di volontariato operanti sul territorio; valutazione dei costi e dei benefici (raggiungimento e mantenimento del *target* terapeutico) associati alla strumentazione fornita e al funzionamento del modello.

Caratteristiche peculiari del modello proposto sono: i bassi costi associati alla strumentazione domiciliare, derivanti dall'utilizzo di strumentazione reperibile sul mercato; la facilità di utilizzo da parte del paziente, eventualmente con l'aiuto di personale senza specifica

formazione sociosanitaria; la possibilità, con costi ragionevoli, di seguire il paziente anche per periodi molto lunghi.

Trasferibilità dei risultati

Il modello ha come obiettivo la realizzazione di soluzioni tecnologiche con caratteristiche di semplicità ed economicità tali da renderlo integrabile nei progetti di assistenza domiciliare e dimissione protetta implementati o in corso di implementazione in diverse realtà sanitarie nazionali.

In aggiunta agli aspetti tecnologici l'attività di ricerca si propone una valutazione socio economica della soluzione implementata al fine di fornire al Servizio Sanitario Nazionale elementi utili per valutarne impatto e sostenibilità. Rappresenta inoltre una possibilità di sviluppo per aziende nazionali operanti nel settore della integrazione di dispositivi medici e *information technology*. Le soluzioni che si intendono realizzare hanno caratteristiche di brevettabilità.

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" dell'OMS, 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 della 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 del Servizio Sanitario Nazionale, il contributo qualificato e aggiornato dell'ISS.

Risultati attesi nel triennio

Contribuire con un qualificato lavoro di analisi e ricerca alla identificazione e valutazione dei rischi sanitari connessi con l'esposizione alle radiazioni non ionizzanti, in particolare, quelli attribuibili ai campi elettrici e magnetici e quelli dovuti alla radiazione ultravioletta emessa dal sole e dalle sorgenti artificiali. Nel campo dei possibili rischi da esposizione ai campi elettrici e magnetici a bassa frequenza e elettromagnetici ad alta frequenza la puntuale caratterizzazione e misura dei livelli dei campi nei volumi di esposizione è di fondamentale importanza ai fini della quantificazione del rischio: Per quanto attiene la radiazione ultravioletta accanto alla dosimetria ambientale lo sviluppo della ricerca nel campo della dosimetria personale costituisce il modo più efficace per quantificare il rischio di danni a breve e a lungo termine (tumori cutanei, danni oculari). È in questo contesto che assume particolare rilevanza lo sviluppo delle ricerche nel campo della dosimetria dell'esposizione dell'occhio.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle attività scientifiche di prevenzione e protezione sono ampiamente utilizzati per attuare programmi specifici di riduzione del rischio basati su strumenti di informazione e educazione sanitaria rivolti ai cittadini esposti in ambienti di vita, ai lavoratori esposti in ambienti di lavoro e a soggetti e gruppi particolarmente a rischio.

Il lavoro teorico e sperimentale svolto in laboratorio è essenziale per attuare una qualificata attività di supporto, consulenza, controllo e verifica che le autorità sanitarie centrali e periferiche nonché altre istituzioni e strutture dello Stato richiedono a questo Istituto. I risultati ottenuti nel settore della dosimetria personale della radiazione ultravioletta sono di interesse anche rispetto a possibili coinvolgimenti di industrie nazionali interessate a questo argomento.

Valutazione del danno motorio

Si intende proseguire la ricerca applicata alla clinica, da anni in corso in ambito diabetologico, mirata allo studio del danno motorio e all'implementazione di efficaci metodi di *screening* e di percorsi terapeutici per la prevenzione delle ulcere plantari in presenza di neuropatia diabetica. Il *focus* della ricerca è attualmente sulla validazione di un metodo di *screening* messo a punto nel corso del triennio precedente e attualmente in uso, presso il Policlinico Universitario "Tor Vergata" (Roma) nell'ambito delle iniziative di *screening* del piede scaturite dall'evento 2005 "Giornata mondiale della prevenzione del piede diabetico". Altrettanto importanti sono gli studi, che si intendono condurre su specifiche alterazioni biomeccaniche, resi possibili dalla messa a punto di sofisticata strumentazione per l'analisi del movimento e di opportuni protocolli di valutazione dell'abilità motoria.

La collaborazione con altri Reparti del suddetto Policlinico e con l'Università di Tor Vergata porterà all'ampliamento delle applicazioni cliniche ad altre importanti patologie del sistema locomotore, e alla implementazione e validazione di innovative soluzioni terapeutiche/riabilitative.

Risultati attesi nel triennio

Miglioramento della sensibilità e specificità delle attuali tecniche di *screening* per la classificazione del danno motorio e per la prevenzione delle ulcere plantari in presenza di neuropatia diabetica. Studi prospettici correlati. Implementazione, monitoraggio e valutazione di efficacia di interventi terapeutici/riabilitativi mirati. Ampliamento della ricerca applicata ad altre patologie dell'apparato locomotore.

Trasferibilità dei risultati

Le tecniche di *screening* nella valutazione dell'appoggio potranno essere integrate nella previsione di sviluppo di ulcere attualmente svolta nell'ambulatorio diabetologico del Policlinico Tor Vergata. Le metodologie diagnostiche di patologie dell'apparato locomotore potranno essere integrate nelle correnti indagini diagnostiche svolte dal Reparto di Medicina Fisica del suddetto Policlinico.

Valutazione delle conseguenze sanitarie di rilasci radioattivi sul medio e lungo termine di rilasci radioattivi

Da diversi decenni viene svolta presso l'Istituto Superiore di Sanità una attività di valutazione delle conseguenze sanitarie di rilasci di materiale radioattivo; in particolare è stato recentemente messo a punto un modello, denominato RANA (*Radiological Assessment of Nuclear Accident*), in grado di valutare, nella sua prima formulazione, le conseguenze sanitarie di un evento incidentale in un impianto nucleare europeo. Dopo gli eventi dell'11 settembre 2001 il modello è stato ampliato in modo da descrivere le diverse situazioni incidentali (derivanti anche da atti ostili interessanti sorgenti di diversa natura) in grado di dar luogo a

conseguenze radiologiche esterne significative sotto il profilo sanitario e per la pianificazione dell'emergenza radiologica. A partire dal 14 febbraio 2003 è stato dichiarato in Italia lo stato di emergenza, in relazione alle attività di smaltimento dei rifiuti radioattivi dislocati nelle regioni Lazio, Campania, Emilia Romagna, Basilicata e Piemonte, in condizioni di massima sicurezza. Gli impianti nucleari in disattivazione e i depositi di rifiuti radioattivi vengono infatti considerati potenziali "obiettivi" di azioni ostili. Una analisi preliminare, già effettuata utilizzando il modello RANA, ha riguardato la valutazione delle conseguenze radiologiche di un atto ostile contro una piscina di stoccaggio del combustibile spento. Le valutazioni fino ad oggi effettuate sono riferite alla fase immediatamente successiva all'evento, senza prendere in esame la pianificazione degli interventi nelle fasi successive dell'emergenza.

Risultati attesi nel triennio

Un primo obiettivo del presente progetto è quello di valutare, utilizzando il modello RANA, l'impatto sanitario di un rilascio intenzionale di materiale radioattivo nell'ambiente. Innanzitutto verrà preso in esame lo scenario della cosiddetta "bomba sporca", cioè la dispersione di sostanze radioattive utilizzando esplosivo convenzionale. Tale scenario è considerato più probabile per la relativa facilità di reperire sorgenti radioattive, dato il loro diffuso utilizzo nei settori medico e industriale e nelle attività di ricerca.

Si intende inoltre analizzare non solo la *early phase*, ma anche le fasi successive di una emergenza. Una delle vie di esposizione che assume particolare rilievo in tali fasi è quella dell'ingestione di alimenti contaminati; si intende pertanto rivedere il modello RANA, che attualmente utilizza fattori di trasferimento ambientale caratteristici di aree nord-europee, in modo da renderlo il più possibile aderente alla situazione italiana. Verranno inoltre definiti i livelli di riferimento per l'introduzione di interventi nella fase intermedia di una emergenza, quali ad esempio restrizioni riguardanti le attività agricole, blocco del consumo degli alimenti contaminati, allontanamento di gruppi di popolazione. Successivamente verranno affrontate le problematiche connesse con gli interventi di recupero del territorio da attuarsi su periodi di tempo più lunghi.

Valutazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici

Una corretta valutazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici è necessaria per qualunque attività di ricerca (di natura osservazionale epidemiologica, o sperimentale di laboratorio che sia) relativa alla problematica degli effetti sulla salute dei predetti campi.

La problematica sarà affrontata sotto due aspetti: 1) la determinazione del campo elettromagnetico non perturbato dalla presenza del sistema biologico in esame; 2) la determinazione dosimetrica del campo interno (perturbato) al sistema biologico stesso.

Saranno effettuati interconfronti tra diverse modalità di valutazione dei campi elettromagnetici imperturbati, per esempio in situazioni specifiche come ambienti residenziali in prossimità di linee elettriche per la trasmissione e distribuzione dell'energia elettrica, come supporto a studi epidemiologici in corso o ancora da realizzare. Tali modalità di valutazione possono essere sia di natura sperimentale (misure di campo) che teorica (utilizzo di metodi di calcolo sulla base di dati relativi alle caratteristiche delle sorgenti), e spesso i metodi sperimentali e teorici devono essere utilizzati in maniera integrata.

Inoltre, saranno effettuate valutazioni teoriche dosimetriche dei campi interni ai sistemi biologici esposti, a supporto delle quali saranno portate avanti le attività sperimentali già in corso di spettroscopia dielettrica consistenti nella misura delle caratteristiche elettriche dei tessuti biologici.

Risultati attesi nel triennio

Un risultato di questo progetto sarà la messa a punto di tecniche di valutazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici che già sono impiegate in diversi studi epidemiologici in corso, come per esempio uno studio in collaborazione con il Reparto di epidemiologia ambientale del Dipartimento "Ambiente e connessa prevenzione primaria" dell'ISS per la valutazione della mortalità e dello stato di salute dei soggetti residenti nei pressi di una linea elettrica a media tensione, e lo studio SETIL caso/controllo sull'eziologia dei tumori del sistema linfemopoietico e del neuroblastoma nel bambino, in corso da alcuni anni in varie regioni italiane. I risultati di questi studi saranno pertanto anche un prodotto dell'attività di ricerca in questione.

Anche ai fini della ricerca sperimentale di laboratorio *in vivo* e *in vitro*, il presente progetto fornirà strumenti di valutazione della reale esposizione dei sistemi biologici esaminati nelle ricerche sperimentali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti potranno essere trasferiti a una qualunque ricerca (epidemiologica o sperimentale) finalizzata allo studio degli effetti sulla salute dei campi elettromagnetici, sia che detta ricerca venga effettuata all'interno dell'ISS, sia che venga svolta presso altre istituzioni scientifiche essendo i risultati comunicabili mediante i normali canali della comunicazione scientifica.

Valutazione di indici elettrocardiografici per la predizione della fibrillazione atriale e ottimizzazione degli approcci terapeutici

La fibrillazione atriale costituisce l'aritmia cardiaca più diffusa, con una prevalenza complessiva del 10% in pazienti sopra i 70 anni. L'80% di questi pazienti avvertono sintomi - palpitazioni, vertigini, stordimento, facile affaticabilità, astenia, sincopi e presincopi - che peggiorano la qualità di vita e l'aspettativa di vita in buona salute. Le aritmie atriali sono responsabili di un netto peggioramento emodinamico e di gravi rischi di fenomeni tromboembolici, comportando un elevato costo sociale e economico. La fibrillazione atriale comporta il maggior numero di giorni di ospedalizzazione rispetto agli altri disturbi del ritmo, un più elevato ricorso al pronto soccorso, un aumento delle visite ambulatoriali, un aumento del numero e della tipologia degli esami, un incremento delle prescrizioni di farmaci. Diversi approcci terapeutici sono attualmente a disposizione del clinico per il trattamento della fibrillazione atriale: trattamento elettrico mediante cardioversione o mediante impianto di *pacemaker*, trattamento farmacologico e trattamento chirurgico mediante ablazione a radiofrequenza. I rischi associati, i costi e le probabilità di successo delle varie metodiche sono molto differenti e in parte dipendenti da aspetti elettrofisiologici della fibrillazione stessa. Il problema della stratificazione del rischio e della scelta della strategia terapeutica più appropriata è tutt'ora oggetto di discussione e ricerca.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone di valutare l'efficacia di un approccio elettrocardiografico per la stratificazione del rischio di fibrillazione atriale parossistica e per l'ottimizzazione della soluzione terapeutica. Gli indici elettrocardiografici verranno calcolati a partire da mappe ECG di superficie, attraverso l'utilizzo di algoritmi avanzati di elaborazione dei segnali, sulla base dell'esperienza acquisita in precedenza. Il mappaggio ECG verrà effettuato mediante un sistema ad alta risoluzione temporale e spaziale costituito da 48 elettrodi attivi, disposti sul torace e sulla schiena del paziente.

I principali obiettivi dell'attività di ricerca sono:

Ricerca di parametri elettrocardiografici per la predizione di episodi di ricorrenza di fibrillazione atriale in pazienti con fibrillazione atriale parossistica attraverso metodiche di analisi di mappe ECG di superficie

Valutazione dell'efficacia di indici elettrocardiografici per la scelta della terapia e sviluppo di nuovi approcci terapeutici

Analisi dei costi, dei benefici, della sicurezza e dei rischi delle soluzioni terapeutiche implementate

Trasferibilità dei risultati

La stratificazione del rischio aritmico nei pazienti con fibrillazione atriale e la predizione di episodi di ricorrenza dell'aritmia rappresentano aspetti importanti dal punto di vista prettamente clinico, e comportano vantaggi significativi per il Servizio Sanitario Nazionale anche dal punto di vista economico.

Questi aspetti, unitamente all'ottimizzazione del trattamento anti-aritmico, potrebbero ridurre i ricorsi al pronto soccorso e le visite ambulatoriali, oltre che indirizzare a un ridotto numero di opportuni esami diagnostici.

Valutazione di tecniche per la stima della meccanica ventricolare

In cardiocirurgia e in cardiologia interventistica la funzione cardiaca è valutata abitualmente mediante diversi parametri emodinamici quali lo *stroke volume* (SV), le pressioni polmonari, arteriosa sistemica, atriale destra e sinistra. Per una più completa valutazione sarebbe tuttavia utile una misura continua del volume e della meccanica del ventricolo sinistro. In particolare la disomogeneità dell'attività meccanica ventricolare (dissincronia), presente anche in condizioni fisiologiche, gioca un ruolo fondamentale in situazioni patologiche quali l'ipertrofia, l'ischemia, l'infarto, o lo scompenso cardiaco. Nei pazienti affetti da scompenso cardiaco, in aggiunta alle alterazioni intrinseche del miocardio e alle anormali condizioni di carico, la disfunzione cardiaca è determinata da dissincronie meccaniche, che comportano una funzione di pompa inefficiente a un costo energetico aumentato. Crescenti evidenze dimostrano come l'efficacia di terapie farmacologiche, chirurgiche e di elettrostimolazione nello scompenso, sia dovuta, almeno in parte, alla riduzione delle dissincronie presenti nel ventricolo sinistro. I metodi attualmente utilizzati per la quantificazione del volume e della meccanica del ventricolo sinistro si basano su tecniche molto diverse in termini di accuratezza, risoluzione temporale, invasività, dipendenza dall'operatore.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi riguardano i seguenti aspetti:

Valutazione e confronto di tecniche invasive e non invasive per la quantificazione della dissincronia ventricolare, in termini di accuratezza della stima, risoluzione temporale, implementazione *real-time*, dipendenza dall'operatore.

Messa a punto di indici per la quantificazione e caratterizzazione delle dissincronie meccaniche.

Sviluppo di modelli matematici della meccanica del ventricolo sinistro in condizioni fisiologiche e in diverse condizioni patologiche per la validazione degli indici proposti.

Trasferibilità dei risultati

Data l'eterogeneità dei metodi per la stima e la quantificazione della dissincronia meccanica ventricolare, la scelta del metodo diagnostico ottimo in termini di costi/benefici per lo studio del paziente con disfunzione cardiaca può risultare difficile. Un confronto oggettivo dei metodi diagnostici attualmente disponibili, risulta quindi utile per capire vantaggi e limiti di ciascuna metodica e indirizzare il medico nella scelta più opportuna per il paziente. La quantificazione della disomogeneità della meccanica cardiaca è utile ai fini non solo di una più completa

diagnosi della disfunzione ventricolare, ma anche per estrarre indici possibili precursori di aritmie ventricolari, per indirizzare la terapia opportuna e per studiare i meccanismi di azione della terapia di resincronizzazione cardiaca.

Valutazione tecnologica *in vitro* dei trattamenti *laser* sui biomateriali e dispositivi dentali tramite microtomografia tridimensionale computerizzata

L'obiettivo principale di questa attività di ricerca è quello di utilizzare la microtomografia tridimensionale computerizzata allo scopo di indagare gli effetti del trattamento *laser* sui biomateriali dentali, lo smalto, la dentina e l'osso, osservati e studiati fino adesso con strumentazione tradizionale (SEM, RX, ecc.)

La microtomografia tridimensionale è una forma miniaturizzata della tomografia assiale computerizzata, meglio nota come TAC, non è distruttiva, non è invasiva e viene usata per creare mappe tridimensionali di piccoli campioni, di solito di pochi centimetri di grandezza, con una risoluzione dell'ordine dei 10 micron. È molto utile per lo studio tridimensionale dei tessuti duri, quali l'osso, poiché fornisce informazioni anche sulla struttura e la concentrazione dei minerali. Viene utilizzata anche nel campo dei materiali, in particolare per i compositi, per i quali è molto importante ottenere le immagini della formazione di eventuali loro fratture con una metodica non distruttiva, quale è appunto la microtomografia tridimensionale.

Questo tipo di indagine, oltre a non prevedere nessuna preparazione del campione da osservare, fornisce una informazione tridimensionale del campione osservato. Tramite una scansione non distruttiva con raggi X di un campione, in condizioni naturali, è possibile avere la sua struttura interna. La combinazione di questa informazione con una ricostruzione tomografica computerizzata permette di ottenere la ricostruzione tridimensionale della microstruttura interna di un campione. L'immagine che si ottiene viene ricostruita dall'insieme di superfici di sezioni piane, che sono state acquisite ed elaborate durante la scansione del campione, e che possono anche essere usate per fornire informazioni di tipo morfologico e densitometrico.

L'attività sarà articolata secondo le seguenti fasi operative:

Preparazione dei campioni secondo i protocolli di prove meccaniche, già studiati e messi a punto nelle esperienze precedenti, dai ricercatori e tecnici che svolgono questa attività.

Osservazioni alla microtomografia tridimensionale dei campioni preparati.

Effettuazione di prove secondo protocolli di prove di *stress* simulante l'utilizzo in situazioni reali.

Osservazioni alla microtomografia tridimensionale dei campioni provati.

Preparazione dei campioni prevedendo l'utilizzo del trattamento *laser* sia sulle superfici sia sulle eventuali interfacce tra biomateriali o tra biomateriali e tessuti animali.

Esecuzione di prove *in vitro* di *stress* meccanico statico e dinamico.

Osservazioni alla microtomografia tridimensionale dei campioni provati.

Comparazione delle osservazioni alla microtomografia con quelle eseguite al SEM, sia prima che dopo le prove, sia su campioni che hanno subito il trattamento *laser* sia su quelli che non lo hanno subito.

Risultati attesi nel triennio

L'utilizzo della microtomografia tridimensionale computerizzata consentirà di acquisire informazioni più complete sulle strutture, sia superficiali sia interne, di biomateriali e di tessuti.

L'uso del *laser* per il trattamento dei materiali dentali, modificandone opportunamente alcune caratteristiche fisiche superficiali, porterà verosimilmente alla ottimizzazione delle proprietà adesive. Similmente, per quanto attiene ai dispositivi dentali, è possibile che il trattamento con il *laser* possa incrementare la disuniformità superficiale degli stessi in modo da ottimizzarne l'interfaccia con le sedi di impianto.

**Dipartimento
Tecnologie e Salute**

Attività di valutazione, controllo, 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: 1) 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; 2) 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; 3) 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 a 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'Istituto Superiore di Sanità, in collegamento con il Centro Nazionale Trapianti, 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: 1) analisi della documentazione tecnica riguardante le strutture edili, gli impianti tecnologici e le principali apparecchiature di assistenza e di monitoraggio; 2) 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; 3) redazione di una relazione tecnica, con i risultati dei rilievi e delle misure eseguite e con parere finale di idoneità. Per quanto riguarda la definizione degli *standard* strutturali e logistici l'attività si realizza mediante partecipazione ai lavori della Consulta permanente per i trapianti e del Centro Nazionale Trapianti. In questo quadro si prevede che le attività descritte continueranno a svolgersi anche in futuro, in collegamento con il Centro Nazionale Trapianti e con i centri regionali, con modalità organizzative che dovranno essere meglio definite. In particolare si rende necessario un adeguamento degli aspetti amministrativi, dato il cambiamento intervenuto nei rapporti tra i soggetti operanti nel settore. Per quanto riguarda gli aspetti tecnici occorre

notare che il processo di rinnovo delle strutture ospedaliere e l'evoluzione delle normative per impianti e attrezzature impongono nuovi e più impegnativi requisiti per il corretto svolgimento degli accertamenti ispettivi. Allo scopo si rende necessario un adeguamento della strumentazione di misura impiegata e un puntuale aggiornamento della documentazione tecnica di riferimento.

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 dei Dispositivi Medici secondo le Direttive Europee (90/385/CEE e 93/42/CEE) per la libera circolazione dei dispositivi medici prevede l'ispezione nei siti industriali di produzione e il controllo del sistema di qualità organizzato dai fabbricanti. Questa attività viene svolta dall'Istituto nella sua veste di Organismo Notificato e prevede ispezioni annuali ai siti produttivi. Per svolgere questi compiti è necessaria da parte degli ispettori una competenza specifica sulle normative europee che regolano la gestione dei sistemi di assicurazione della qualità integrata da una competenza tecnica sia sui processi produttivi che sui prodotti stessi. Qualora sia necessaria o consigliabile viene richiesta consulenza a specialisti di prodotto di altri reparti del Dipartimento. Il Dipartimento si occupa di prodotti ad alto o medio rischio. Questa attività produce introiti per l'Istituto, in quanto i fabbricanti effettuano pagamenti per le prestazioni dell'Istituto. Attualmente le società che si avvalgono dell'opera dell'Organismo Notificato svolta dal nostro Dipartimento sono dieci, ma è presumibile che a causa della pubblicazione di nuove direttive ci sarà un maggiore afflusso di richieste. Potrebbe essere particolarmente vantaggioso, contemporaneamente a un potenziamento delle risorse umane, aumentare la quantità di "clienti" incrementando di conseguenza i proventi dell'Istituto.

Attività di consulenza e controllo attinenti la problematica amianto

Attività di consulenza tecnico-scientifica e di formazione su richiesta degli organi del Servizio Sanitario Nazionale, 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 14/05/96).

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

Si prevede la prosecuzione dell'attività consulenza e controllo attinenti la problematica amianto.

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

Si prevede la prosecuzione dell'attività di controllo attinente la problematica dei corpi estranei nei farmaci.

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 D M 24 Giugno 2004 sulla base del quale i fabbricanti effettuano i pagamenti per la certificazione richiesta. Attualmente vengono emessi dal Dipartimento Tesa 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

Programmazione del piano "Manutenzione e adeguamenti delle attrezzature sperimentali dei laboratori di prova dell'esame del Tipo"

Definizione delle risorse necessarie a mantenere l'attività e i suoi risultati

In funzione delle necessità del mercato dei DM si può supporre in media che l'attività corrisponderà almeno a quella media degli ultimi tre anni.

Attività di rinnovo delle certificazioni già emesse e in scadenza nel triennio

Definizione di un piano di incremento dell'attività in funzione delle risorse disponibili da parte dell'amministrazione ISS

Procedurazione dei percorsi di certificazione in funzione della classificazione dei dispositivi medici

Definizione di situazioni critiche che necessitano di procedure speciali appropriate

Definizione di un "Panel per la Valutazione delle Sperimentazioni Cliniche di Dispositivi Medici innovativi"

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 del 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: a) procedure relative alle pratiche radiologiche clinicamente sperimentate; b) criteri di riferimento per le esposizioni mediche; c) raccomandazioni per l'espletamento di verifiche cliniche in ambito professionale specialistico; d) criteri di accettabilità delle apparecchiature radiologiche; e) valutazione dei piani di emergenza radiologica; f) 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 nel triennio 2006-2008 una ragguardevole attività di consulenza legata ad elaborazione di linee guida e di decreti attuativi delle leggi già emanate. L'effettiva articolazione nei vari argomenti dell'attività collegata ai decreti attuativi dipenderà dagli orientamenti del Ministero della Salute in merito alle azioni ritenute prioritarie.

Si prevede la partecipazione attiva nel confronto sulle nuove linee di tendenza della radioprotezione e nell'analisi delle implicazioni sulle legislazioni e normative nazionali. Questo si otterrà partecipando all'attività della Commissione e dei Gruppi di esperti..

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 Tesa o di altri Dipartimenti dell'Istituto qualora necessario.

Piano triennale

L'attività in oggetto proseguirà coerentemente come già definito nella descrizione, in funzione delle segnalazioni di eventi avversi ("incidenti o mancati incidenti") che si verificheranno nel mercato dei Dispositivi Medici; in tal senso non è possibile fornire una programmazione puntuale.

Disattivazione impianti nucleari e gestione rifiuti radioattivi

Le problematiche connesse con la disattivazione degli impianti nucleari e la gestione dei rifiuti radioattivi vengono affrontate da diversi anni tramite l'analisi dei progetti di disattivazione degli impianti e di deposito dei rifiuti presentati dall' esercente in sede di Commissione Tecnica per la Sicurezza Nucleare e la Protezione Sanitaria (art. 9 DL.vo. 230/95).

A seguito degli eventi dell'11 settembre 2001 è stato dichiarato lo stato di emergenza in relazione alle attività di smaltimento dei rifiuti radioattivi dislocati nelle regioni Lazio, Campania, Emilia Romagna, Basilicata e Piemonte (decreto della Presidenza del Consiglio dei Ministri del 14/02/03) e successivamente è stata emanata l'Ordinanza del PCM n. 3267, con la quale sono stati dati poteri di Commissario straordinario al Presidente della SoGIN per la messa in sicurezza dei materiali nucleari, nonché per la predisposizione di piani per l'avvio delle procedure di smantellamento delle centrali nucleari in deroga alla normativa vigente. Tale ordinanza di protezione civile era motivata dall'urgenza di proteggere i siti nucleari da eventuali attacchi di tipo terroristico. Con la stessa Ordinanza è stata costituita una Commissione Tecnico-Scientifica con compiti di "alta vigilanza" sull'operato del Commissario della quale fa parte un rappresentante dell'ISS. Lo stato di emergenza è ancora in vigore e proseguono le attività della Commissione.

Piano triennale

Si prevede di affrontare le seguenti tematiche:

Gestione dei rifiuti radioattivi e del combustibile irraggiato;

Individuazione di un sito per il deposito nazionale dei rifiuti radioattivi.

Proseguirà, inoltre, l'attività volta all'esame dei progetti riguardanti sia la disattivazione degli impianti nucleari presenti sul territorio italiano sia i depositi di rifiuti radioattivi sui siti nucleari.

Emissione di pareri, valutazione di dossier per marcatura CE, effettuazione di visite ispettive di controllo e sorveglianza, controllo di dispositivi medici sia per marcatura CE, sia sequestrati dai NAS

Alcune delle attività di seguito sinteticamente descritte sono svolte da circa dieci anni, sia autonomamente, sia nell'ambito della collaborazione con il Laboratorio di Tossicologia Applicata; le attività di certificazione e ispettive sono iniziate dopo l'attuazione della Direttiva CEE n. 42 del 1993 sui dispositivi medici, recepita con il DL.vo n. 46 del 1997. I pareri sono richiesti da Ministeri, Autorità Giudiziaria, Parlamentari, ecc. e, quando relativi alla marcatura CE di dispositivi medici non attivi e al loro controllo per malfunzionamento dopo il sequestro da parte dei NAS, sono emessi dopo valutazione di *dossier*, controllo di campioni e dopo l'eventuale effettuazione delle prove pertinenti. L'attività ispettiva è effettuata presso le Aziende produttrici di dispositivi medici non attivi, in Italia e all'estero, sia ai fini della concessione della marcatura CE, sia nell'ambito della successiva sorveglianza mirata al controllo del mantenimento del Sistema di Assicurazione della Qualità e della idoneità della struttura produttiva. Tale attività, a partire dal 2002, sarà notevolmente incrementata per la scadenza e il rinnovo delle marcature CE precedentemente concesse. Si sottolinea che tutte le attività sono

espletate secondo le Procedure del Sistema di Assicurazione della Qualità in vigore presso il Dipartimento.

Piano triennale

Secondo quanto previsto dalla vigente normativa, i dispositivi medici devono rispondere a fondamentali requisiti di sicurezza relativi all'utilizzatore in generale e al paziente in particolare. Nel caso di malfunzionamenti che possono generare incidenti o mancati incidenti è prevista la segnalazione al Ministero della Salute il quale è tenuto ad allertare i NAS che provvedono alla acquisizione dei campioni oggetto di contenzioso insieme a campioni nuovi appartenenti allo stesso lotto. Il complesso dei campioni perviene all'Istituto e, quando di competenza, al Dipartimento di Tecnologie e Salute per i relativi controlli che vengono effettuati presso i Reparti che dispongono del personale e delle attrezzature adeguate al loro svolgimento.

Presso il Reparto di Patologia Infettiva Ultrastrutturale vengono effettuati controlli di tipo morfologico sui campioni sequestrati mediante tecniche di stereomicroscopia e di microscopia elettronica a scansione al fine di individuare le cause del malfunzionamento documentabili con immagini; eventuali controlli della composizione in elementi dei materiali costituenti i dispositivi, anche in relazione all'attività di certificazione ai sensi dell'Allegato IV del DL.vo 46/97, e/o prove meccaniche sugli stessi, sono affidati ai Reparti di competenza.

Tale attività di controllo che ha impegnato l'ultimo triennio, come peraltro gli anni preceenti, sarà proseguita nell'arco del triennio 2006-2008 con un prevedibile incremento se si considera l'andamento rilevato nel corso degli anni (2003:7; 2004:9; 2005:16).

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 un'analogia attività per la radiodiagnostica.

Piano triennale

La peculiarità dei Gruppi di Studio per l'Assicurazione di Qualità in Radioterapia e in Radiodiagnostica è proprio quella di farsi portavoce di esigenze che nascono nel mondo sanitario nella logica di un Miglioramento continuo della Qualità attraverso l'elaborazione di linee guida su tematiche di rilievo e attraverso la formazione con organizzazione di Corsi e Convegni o Giornate di Studio su argomenti che saranno di volta in volta recepiti e discussi all'interno dei Gruppi di Studio. Particolare attenzione sarà dedicata a richieste di consulenza e collaborazione che Centri e Regioni potranno per l'utilizzazione degli strumenti di valutazione che nel corso degli anni sono stati messi a punto dai diversi gruppi di lavoro.

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'Istituto Superiore di Sanità 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'Istituto Superiore di Sanità 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

Proseguiranno 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;
- aggiornamento del Piano Nazionale delle misure protettive contro le emergenze radiologiche;
- analisi delle problematiche connesse con l'informazione della popolazione in caso di emergenze radiologiche;
- partecipazione alle esercitazioni nazionali e internazionali di emergenza.

Si prevede, inoltre, di affrontare, nell'ambito CEVaD, le problematiche connesse con la gestione di un'emergenza radiologica nelle fasi a medio e lungo termine.

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 artificiale che naturale. Tali attività sono fortemente collegate con quelle di ricerca, in quanto fanno uso delle competenze ottenute mediante essa, e si svolgono su tematiche in continua evoluzione.

Queste attività consistono in:

- attività di consulenza per il Ministero della Salute 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 internazionali (Unione Europea, OMS, AIEA), e ai relativi gruppi di lavoro;
- preparazione e discussione (in sedi informali e formali) di bozze di normative sanitarie di particolare rilievo tecnico-scientifico;
- attività di formazione del personale del Servizio Sanitario Nazionale, di enti e altre strutture pubbliche con responsabilità nei settori di interesse, mediante lezioni, seminari e

corsi o *workshop* 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:

- il coordinamento della realizzazione del Piano Nazionale Radon, affidata all'Istituto Superiore di Sanità dal Ministero della Salute, nell'ambito dei progetti del Centro di Prevenzione e Controllo delle Malattie (CCM). Nel PNR sono previste, tra le altre, azioni di valutazione del rischio per la popolazione italiana, interventi normativi sul radon nelle abitazioni, di informazione della popolazione e formazione degli operatori del SSN
- il completamento dell'inventario dei preparati di radio – di proprietà del Ministero della Salute e distribuiti in passato agli ospedali italiani – finalizzato alla messa in sicurezza degli stessi e al loro ritiro da parte del Ministero della Salute
- NORM (*Naturally Occurring Radioactive Materials*) generati dall'utilizzo, in particolari processi industriali, di materiali ad elevata concentrazione di radioattività naturale: preparazione di una normativa europea e istruttoria su siti contaminati da fosfogessi.
- l'uranio impoverito come possibile sorgente di esposizione per il personale militare e civile impiegato in teatri post bellici
- la radioattività nelle acque potabili, termali e minerali; per le acque potabili, in particolare, è prevista la pubblicazione di una nuova direttiva europea che richiederà il recepimento da parte degli stati membri e sarà l'occasione per recepire la raccomandazione europea che limita la concentrazione di radon nelle acque potabili
- i rottami metallici potenzialmente contaminati da radioattività di cui è previsto il controllo alle frontiere: a tal fine sarà necessaria la stesura di protocolli di misura per la più efficace rivelazione e di azioni da intraprendere nel caso di rilevamento

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 03/11/84 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 del Servizio Sanitario Nazionale.

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 triennio 2006-2008 l'attività del laboratorio di prova dei *pacemaker* e dei suoi accessori continuerà sia sulla base dell'esperienza acquisita negli anni precedenti che sulla solida tradizione della struttura nel campo specifico.

In particolare per quanto riguarda l'attività del laboratorio di prova a supporto della certificazione di tipo si prevede di implementare nuove procedure di prova mediante la realizzazione di nuovi sistemi di misura specificatamente realizzati per rispondere ad eventuali norme tecniche emesse nel periodo di riferimento. In ogni caso sulla base dei risultati ottenuti negli anni precedenti, si può stimare di effettuare prove tecniche su circa 10 *pacemaker*/anno con un tempo medio di lavorazione di circa 25 giorni per *pacemaker* a cui vanno aggiunti circa 5 giorni lavorativi per *pacemaker* relativi alla valutazione dei contenuti del *dossier* tecnico di prodotto. Per quanto riguarda i programmatori la stima che si può fare è di 4 programmatori/anno con un tempo medio di lavorazione di 15 giorni per programmatore a cui vanno aggiunti 3 giorni per programmatore per la valutazione del *dossier* tecnico.

Allo stesso modo si prevede di portare avanti la valutazione del rischio e il controllo ai fini della sorveglianza e vigilanza dei dispositivi medici impiantabili attivi su richiesta specifica degli organi del Servizio Sanitario Nazionale e delle Regioni. Sulla base degli anni precedenti è possibile stimare per questi ultimi una media di 7 pareri/anno con un tempo medio di lavorazione di 15 giorni /parere.

Sulla base del numero di ditte che attualmente costruiscono *pacemaker* in Italia, si prevede inoltre di effettuare mediamente 4 ispezioni/anno della durata media di 4 giorni ad ispezione ai sistemi di qualità delle ditte fabbricanti. Infine per quanto riguarda l'elaborazione di norme tecniche e direttive in ambito comunitario sui dispositivi medici impiantabili attivi si prevede di partecipare a circa 10 Commissioni tecniche in ambito CEI e CENELEC con principalmente lo scopo di rivedere l'attuale norma verticale sui dispositivi medici impiantabili attivi destinati al trattamento di bradiaritmie (CEI EN 45502-2-1) e l'elaborazione e auspicabile emanazione di una nuova direttiva europea specifica per i lavoratori portatori di *pacemaker* e defibrillatori impiantabili, avente per oggetto l'immunità elettromagnetica di tali dispositivi.

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: a) certificazione del tipo per i dispositivi medici secondo lo schema della direttiva 93/42 CEE (allegato III) b) valutazione del rischio associato con l'uso di dispositivi medici ai fini dell'emissione di pareri per gli organi del Servizio Sanitario Nazionale c) 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 a un progetto del quinto programma quadro della Comunità Europea.

Piano triennale

L'attività del triennio sarà coerentemente la continuazione di quanto già previsto in precedenza con l'obiettivo di mantenere aggiornato il laboratorio di Biomeccanica Cardiovascolare e migliorarne la dotazione grazie sia a nuove realizzazioni o acquisizioni, sia grazie alle collaborazioni universitarie; queste ultime giocano un ruolo rilevante in tutti quei casi in cui la tecnologia di interesse non è agevolmente acquisibili in ISS per limiti relativi alla disponibilità di risorse o agli alti costi economici e temporali di sviluppo.

Si considerano prioritari i seguenti obiettivi da conseguire per mantenere attivo il supporto alle attività istituzionali di ricerca e controllo dell'ISS:

- qualificare nuovi sistemi per prove strutturali di protesi cardiache valvolari
 - mettere a punto di metodi innovativi per la determinazione di danno strutturale nei tessuti e nei materiali usati nel progetto di protesi per il sistema cardiovascolare
 - mettere a punto di protocolli sperimentali per l'uso di tecniche innovative per lo studio dei campi fluidodinamici a valle di dispositivi protesici per il sistema cardiovascolare
 - mettere a punto di protocolli sperimentali per la caratterizzazione di esperienze di insemminazione cellulare (endoteliali e staminali) su substrato per dispositivi protesici innovativi
 - definire protocolli di prova per lo studio sperimentale *in vitro* mediante *Particle Image Velocimetry*
 - determinazione al fine di identificare indici di rischio relativamente alle complicanze emolitiche e trombogeniche di protesi cardiache valvolari
 - definire protocolli di prova per lo studio sperimentale *in vitro* idraulico al fine di identificare e verificare indici di prestazione usati in ambito clinico come l'EOA (*Effective Orifice Area*) per conseguire un migliore uso delle tecniche diagnostiche quali l'ecocardiografia, nel caso delle protesi cardiache valvolari
 - effettuare confronto numerico sperimentale (*in vitro - in silico*) relativamente a indici di rischio e prestazione dei dispositivi protesici impiantati nel sistema cardiovascolare
- In particolare, alla fine del triennio, si farà particolare attenzione al risultato clinico, in termini di ricadute, relativamente alle attività di formazione, ricerca e controllo grazie alla valutazione degli indici utilizzati

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: a) certificazione CE di tipo (allegato III) secondo la direttiva 93/42 CEE relativa ai dispositivi medici b) valutazione del rischio associato con l'uso

di tali dispositivi medici ai fine dell'emissione di pareri per gli organi del Servizio Sanitario Nazionale c) 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

Nel triennio 2006-2008 si prevede di implementare nuovi protocolli di prova e realizzare specifici sistemi di misura anche alla luce della evoluzione tecnologica di tali dispositivi medici. Verranno quindi emesse certificazioni CE del tipo, espressi pareri per il Servizio Sanitario Nazionale ed eseguiti controlli sui prodotti sequestrati dai NAS.

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'Istituto Superiore di Sanità 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

La programmazione dell'attività oltre il 2006 sarà condizionata dal rinnovo dei membri del Comitato in occasione dell'inizio del 7° Programma Quadro.

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 24/02/99 che lo ha istituito. In particolare dovrà fornire le valutazioni sulle sperimentazioni cliniche dei medicinali previste dai Decreti ministeriali 18/03/98 e 19/03/98, oltre che su tutte le attività di competenza dell'ISS che richiedono una valutazione etica, comprese quelle svolte con finanziamenti esterni e i programmi multilaterali. La competenza specifica è conseguenza della pregressa partecipazione alla Commissione bioetica dell'ISS e alla partecipazione ai lavori del Comitato Nazionale di Bioetica.

Piano triennale

Saranno predisposte le riunioni necessarie per la valutazione e il monitoraggio dei progetti che lo richiedano. Sarà proseguita l'attività del Comitato Etico in accordo con la normativa.

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 del Servizio Sanitario Nazionale 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 Laboratorio 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

L'attività prevede di mantenere aggiornati gli strumenti necessari per condurre appropriate analisi dei rischi (ad es. liste di danno ecc.) derivanti dall'applicazione di tecnologie sanitarie, specialmente relative ai Dispositivi Medici.

Redazione di nuovi schemi di analisi dei rischi per dispositivi innovativi.

Sulla base di queste premesse tecnico scientifiche gli esperti del Dipartimento TESA dell'ISS sono disponibili per gli interventi richiesti dalle varie autorità di settore (Ministro della Salute, Consiglio Superiore di Sanità, Preture, le Regioni e in generale per tutti gli organismi del Servizio Sanitario Nazionale).

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" dell'OMS, 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 della 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 del Servizio Sanitario Nazionale, il contributo qualificato e aggiornato dell'ISS.

Piano triennale

Nel primo triennio si prevede di continuare l'attività di ricerca volta a identificare e valutare i rischi connessi con l'esposizione alle Radiazioni Non Ionizzanti nelle diverse situazioni e tipologie di esposizione presenti nei vari ambienti di vita, di lavoro e nelle strutture sanitarie. In particolare, considerato che un numero ragguardevole di cittadini italiani ritiene l'esposizione ai campi elettromagnetici, anche di bassa intensità, molto rischiosa per la propria salute, verranno sviluppate idonee iniziative di informazione ed educazione sanitaria, basate esclusivamente sulle conoscenze scientifiche aggiornate, che possano far comprendere i termini reali di detto rischio. Proseguirà il coinvolgimento dei ricercatori del reparto nei programmi e nelle attività di prevenzione e protezione promossi da istituzioni internazionali (OMS, ICNIRP, UE, Euroskin, ICOOH, ecc.) e nazionali (AIRM, AIRP, ecc.). Si intende proseguire l'attività di ricerca sperimentale di base e applicata volta a contribuire al progresso delle conoscenze e delle capacità d'intervento in questo settore della protezione. In particolare, verranno ulteriormente sviluppate le ricerche nel settore della spettroscopia dielettrica anche per esplorare la fattibilità di possibili applicazioni in campo medico. Nel campo della protezione dalla radiazione ultravioletta sarà continuata l'attività finalizzata all'informazione e all'educazione sanitaria e verrà ulteriormente incrementata la ricerca nel campo della dosimetria personale, in particolare, lo sviluppo di dosimetri personali per la misura dell'esposizione oculare. Con l'aiuto e la collaborazione di istituzioni nazionali (CNR, A.M.) e internazionali (BFS- Germania) si cercherà di attivare una stazione permanente di misura della irradianza solare al suolo nell'area dell'ISS al fine di misurare le dosi ambientali di radiazione UV solare disponibili.

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

A prosecuzione dell'attività svolta fino al 2005, nel triennio 2006-2008 proseguiranno le valutazioni tecniche di artroprotesi d'anca finalizzate alla certificazione dei dispositivi (apposizione sul prodotto del marchio CE ai sensi della Direttiva della Comunità Europea 93/42

relativa ai dispositivi medici). Tali valutazioni consistono nell'esame del *dossier* tecnico che i produttori forniscono, insieme al prodotto da certificare, al momento della presentazione della domanda di certificazione. L'analisi del *dossier* e del prodotto vengono eseguite al fine di verificare la rispondenza ai requisiti essenziali come da indicazioni riportate nella suddetta Direttiva. Se ritenute necessarie, inoltre, verranno effettuate prove meccaniche di tipo come indicato dalle normative vigenti. La crescente diffusione degli interventi di artroprotesi, la particolare complessità della funzione articolare che si intende ripristinare, i correlati rischi di interventi chirurgici correttivi, e l'intento di raggiungere un livello ottimale di sicurezza e tutela della salute riducendo il più possibile i problemi legati alla progettazione dei dispositivi protesici impiantabili, hanno indotto a una riclassificazione degli stessi. Come riportato nella Direttiva 2005/50/CE (11 agosto 2005) relativa alla riclassificazione delle protesi articolari dell'anca, del ginocchio e della spalla nel quadro della Direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici, "in deroga alle regole di cui all'allegato IX della direttiva 93/42/CEE le protesi dell'anca, del ginocchio e della spalla sono riclassificate come dispositivi medici che rientrano nella classe III" (art. 1). Alla luce di tale riclassificazione, si prevede un accurato studio di fattibilità relativo alla riorganizzazione del laboratorio per le prove di tipo in termini di materiali documentali, strumentazione e risorse umane. Nell'ambito delle attività istituzionali, su richiesta del Ministro, del Presidente dell'ISS e dei NAS, verranno inoltre emessi pareri su interrogazioni relative all'utilizzo di dispositivi ortopedici, a segnalazioni di incidenti o mancati incidenti che coinvolgono i suddetti dispositivi, a informazioni tecniche relative ai materiali costruttivi utilizzati per la realizzazione degli stessi.

**Centro Nazionale AIDS
per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS**

Attività di ricerca

Delivery e modulazione della presentazione di antigeni da parte di Tat in cellule endoteliali vascolari e linfatiche per l'induzione di un'immunità protettiva contro HIV

Le cellule endoteliali del sistema vascolare e linfatico stabiliscono importanti rapporti funzionali con il sistema immune. Esse, ad esempio, producono citochine che richiamano cellule immunitarie e incrementano l'attività co-stimolatoria e la presentazione dell'antigene da parte dei monociti che trasmigrano ai siti di infiammazione, promuovendone, al tempo stesso, il differenziamento in cellule dendritiche (DC) o in macrofagi. Le cellule endoteliali stesse agiscono quali cellule presentanti l'antigene (APC), poiché, quando vengono attivate, esprimono molecole MHC di classe I e II, e molecole co-stimolatorie; internalizzano, processano e presentano antigeni ai linfociti T CD4 e CD8 naive e memoria, e inducono l'espressione di molecole co-stimolatorie nei linfociti CD4 adesi all'endotelio, determinando la trans-costimolazione di cellule T adiacenti. In virtù di queste proprietà, le cellule endoteliali giocano un ruolo cruciale nell'induzione delle risposte immuni locali, poiché reclutano APC ai siti di danno tissutale e, presentando antigeni alle cellule T circolanti, richiamano linfociti antigene-specifici ai siti di infezione. Le cellule endoteliali, inoltre, sono isolabili da tessuti, e dal sangue periferico (cellule endoteliali circolanti). Scopo di questo progetto è sfruttare queste caratteristiche delle cellule endoteliali a scopi vaccinali. In questo contesto, i nostri studi hanno indicato che la proteina Tat, rilasciata dalle cellule T acutamente infettate, è selettivamente internalizzata, mediante integrine, sia da cellule dendritiche che endoteliali attivate. Inoltre, Tat induce in entrambi i tipi cellulari l'espressione di citochine e chemochine di tipo Th1, recettori per l'*homing* dei leucociti, e molecole co-stimolatorie. Perciò, Tat potrebbe essere utilizzata per come vettore per dirigere immunogeni di HIV/SIV agli endoteli e/o come adiuvante per indurre o accrescere la capacità di presentazione antigenica delle cellule endoteliali vascolari e linfatiche.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone i) di isolare ed espandere cellule endoteliali vascolari e linfatiche e leucociti dal derma, dalle tonsille e/o dal sangue periferico di donatori HIV negativi e positivi mediante selezione negativa e positiva o FACS-*sorting*; ii) determinare in queste cellule (attivate e non attivate) l'espressione di MHC-I e II e di molecole co-stimolatorie (ICAM, VCAM, LFA-3, CD80, CD83, CD86, CD40); iii) Determinare i *pathway* e le cinetiche di legame e internalizzazione, localizzazione sub-cellulare e *trafficking* di Tat in queste cellule; iv) somministrare alle cellule endoteliali di antigeni di HIV da soli o combinati/fusi a Tat per analizzare la capacità delle cellule endoteliali di presentare gli antigeni a linfociti autologhi; v) valutare la capacità di Tat di modulare nelle cellule endoteliali l'attività del proteasoma e il processamento di antigeni di HIV; vi) valutare *in vivo* la capacità di Tat di riconoscere e dirigere agli endoteli attivati altri antigeni di HIV (in particolare Env); vii) indurre risposte immuni contro HIV in topi mediante il *delivery* Tat-mediato di antigeni agli endoteli; viii) valutare la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia di questi approcci vaccinali in modelli murini utilizzando quale *challenge* vettori erpetici patogenici esprimenti gli antigeni di HIV.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi consentiranno di acquisire informazioni relative al *cross-talk* del sistema vascolare e del sistema immune, alla capacità di processamento e presentazione antigenica degli endoteli e al loro ruolo nel priming e nel richiamo di risposte immuni contro patogeni e antigeni, in particolare HIV. Inoltre, da questi studi emergeranno nuove strategie di immunizzazione e vaccinazione basate sul *targeting* degli endoteli vascolari e linfatici con Tat, che verranno validate in modelli animali per il loro trasferimento alla sperimentazione vaccinale nell'uomo.

“Pathway di segnale indotti da Tat nella regolazione del ciclo cellulare”

Il sarcoma di Kaposi (KS) insorge in un contesto di immunodisregolazione caratterizzato da aumentata produzione di citochine infiammatorie, quali gammaIFN, IL-1beta e TNFalpha. Queste citochine attivano gli endoteli e inducono la produzione di fattori angiogenici (bFGF, VEGF) che sono espressi ad elevati livelli nelle lesioni. I nostri studi hanno indicato che la proteina Tat di HIV, rilasciata dalle cellule T acutamente infettate, agisce da fattore di progressione del KS in quanto promuove la crescita, l'adesione, la migrazione e l'invasione delle cellule endoteliali attivate e delle cellule KS. Questi effetti sono mediati dal legame della sequenza RGD di Tat alle integrine alpha5beta1 e alphavbeta3, che sono espresse ad elevati livelli sulla superficie di queste cellule. La regione basica di Tat, inoltre, compete con bFGF per il legame agli eparan solfati, rilasciando bFGF in forma biologicamente disponibile. Il segnale di adesione e di crescita attivati da Tat e bFGF cooperano nell'indurre angiogenesi e la proliferazione delle cellule endoteliali attivate e delle cellule KS. È noto che le integrine attivano vari *pathway* di traduzione del segnale, tra cui il *pathway* Ras/ERK, che media la proliferazione cellulare. Sono stati perciò avviati studi volti a verificare se il legame di Tat alle integrine possa promuovere l'attivazione di questo *pathway* in cellule endoteliali, e se la sua associazione con bFGF ne induca l'ingresso nel ciclo cellulare.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione degli effetti di Tat sul *pathway* di trasduzione del segnale Ras/ERK (ERK1/2) in cellule endoteliali e identificazione dei domain di Tat responsabili dell'attivazione del *pathway*;

Determinazione del ruolo delle small GTPasi, in particolare Ras e Rac, nel *pathway* stimolato da Tat;

Determinazione della capacità di Tat di indurre fosforilazione di Shc e *recruitment* di Grb-2.

Determinazione della capacità di Tat, in associazione con bFGF, di stimolare cellule quiescenti ad entrare nella fase S del ciclo cellulare.

Trasferibilità dei risultati

Il blocco della trasduzione del segnale mediata da fattori di crescita o recettori cellulari disregolati nelle cellule neoplastiche (in particolare tirosin chinasi di membrana e recettori integrinici) è alla base di intensa sperimentazione preclinica e clinica per l'allestimento di terapie innovative contro i tumori. In questo contesto, gli studi su Tat contribuiranno non solo a definire i meccanismi con cui Tat agisce da fattore di progressione nell'AIDS-KS, ma porteranno all'identificazione di nuovi *target* per il blocco dell'attivazione, della crescita e della sopravvivenza delle cellule endoteliali e KS. L'identificazione di questi *target* aprirà nuove prospettive per lo sviluppo di terapie antiangiogeniche e antitumorali non solo per il KS ma anche per altri tipi di tumori, nei soggetti infettati e non infettati da HIV.

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-progressors*”, 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 questo “approccio” permette di mettere in relazione i fattori di protezione all'efficacia del vaccino. Primati non umani vaccinati o *naive*, infettati o non con SHIV, rappresentano un altro ambito sperimentale ideale 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, sono 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 nelle coorti e nei modelli sopra descritti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di implementare la casistica di progressori, LTNP e MEU e al tempo stesso iniziare il censimento dei campioni biologici (sangue periferico, linfociti o cellule mononucleate congelate) e le analisi 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, di soggetti vaccinati o trattati con *placebo* infettati e non infettati da HIV, per l'analisi di trascrittoma e del proteoma (quale studio neste e previo 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 *naive* infettati non infettati potranno essere esaminati sia a livello del sangue periferico che tissutale per il genoma, il trascrittoma e il proteoma, 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 obbiettivo per la valutazione, l'implementazione, la validazione e lo sviluppo futuro delle terapie farmacologiche e vaccinali contro l'HIV/AIDS.

Attività anti-tumorale degli inibitori delle proteasi di HIV e degli NNRTI in associazione o meno a chemioterapia: studi preclinici

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 della cervice uterina. Il trattamento con HAART, inoltre, è spesso associato alla regressione di queste neoplasie. Ciò riflette la soppressione della replicazione di HIV, la ricostituzione del repertorio immunitario, e il ripristino di efficaci risposte immuni contro i virus oncogeni associati a queste neoplasie. Studi recenti indicano, tuttavia, che la terapia HAART eserciti sui tumori anche effetti addizionali e indipendenti dalle sue azioni su HIV e sul sistema immunitario. In questo contesto, in uno studio recente è stato riportato che la remissione completa della malattia è raggiunta nei pazienti trattati con HIV-PI, ma non con NNRTI. È stato inoltre riportato che la sostituzione degli HIV-PI con gli NNRTI nei soggetti trattati si accompagna alla ricomparsa o alla recrudescenza del KS. I nostri studi

hanno indicato che gli HIV-PI esercitano potenti azioni anti-angiogeniche e anti-tumorali, poiché sono in grado di bloccare l'invasione delle cellule endoteliali e neoplastiche. Con questo progetto intendiamo determinare, mediante studi preclinici, retrospettivi, e prospettici, l'azione antiangiogenica e antitumorale di terapie HAART basate sugli HIV-PI o sugli NNRTI, in associazione o meno a chemioterapici, identificare nuovi *target* per la terapia antiangiogenica e antineoplastica e sviluppare e validare nuovi analoghi e derivati degli HIV-PI dotati di maggiore efficacia e minore tossicità per la gestione clinica dei pazienti oncologici infettati da HIV e per l'allestimento di terapie innovative contro i tumori.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati del progetto possono essere così riassunti:

Valutazione dell'attività anti-angiogenica e anti-tumorale degli HIV-PI in associazione o meno a NNRTI o chemioterapici (doxorubicina e cisplatino) in modelli di tumori sperimentali *in vivo* e *in vitro*.

Determinazione dei meccanismi molecolari alla base degli effetti anti-angiogenici e anti-invasivi degli HIV-PI in associazione o meno a NNRTI o chemioterapici.

Identificazione di nuovi *target* per la terapia antiangiogenica e antineoplastica.

Individuazione e validazione di analoghi e derivati degli HIV-PI con accresciuta attività anti-angiogenica e anti-tumorale.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi preclinici proposti daranno un contributo importante e immediato per le future linee guida relative al trattamento del soggetto infettato da HIV con tumore o a rischio di sviluppare tumori, oggi orientate all'impiego degli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa come farmaci di prima linea sostitutivi degli HIV-PI.

Il trasferimento di queste conoscenze alla pratica clinica permetterà l'allestimento di terapie innovative non solo per il trattamento antitumorale sia di pazienti HIV positivi che sieronegativi, ma anche per il controllo dei tumori e di patologie reattive e degenerative nei soggetti non infettati.

Per queste ragioni, lo sviluppo del progetto proposto promette di tradursi in concrete innovazioni per la pratica clinica e in un effettivo miglioramento della salute dei cittadini attraverso le attività del Servizio Sanitario Nazionale.

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 raro 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 è caratterizzato da intensa angiogenesi e origina in un contesto di immunodisregolazione caratterizzato da aumentata produzione di citochine infiammatorie (gammaIFN, IL-1beta, TNFalpha), induzione di fattori angiogenici e metalloproteasi della matrice (MMP), e polarizzazione Th1 della risposta immune. Non vi è trattamento d'elezione per il KS, e le terapie convenzionali manifestano elevata tossicità, hanno carattere palliativo, ed efficacia parziale e temporanea. Vi è perciò una grande urgenza di terapie innovative per il trattamento di questa malattia. Recentemente è stata descritta una ridotta incidenza o regressione del KS nei soggetti infettati da HIV trattati con terapie antiretrovirali di combinazione contenenti almeno un inibitore della proteasi di HIV (HIV-PI). Studi di base e preclinici precedentemente condotti nel Centro hanno indicato che questi farmaci sono in grado di inibire l'angiogenesi e l'invasione tumorale mediante il blocco dell'attivazione proteolitica di MMP-2, una MMP che svolge un ruolo essenziale nell'angiogenesi e nell'invasione tumorale. Per valutare le azioni antitumorali

di questi farmaci, è stata avviata una sperimentazione clinica multicentrica di fase II per il trattamento con Indinavir, uno degli HIV-PI, in pazienti anziani non infettati da HIV affetti da CKS. La sperimentazione avviene nel quadro dell'Azione Concertata sul Sarcoma di Kaposi (Programma Nazionale AIDS), in collaborazione con Merck Italia.

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 al Servizio Sanitario Nazionale (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 e 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 esprimenti 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 e 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

Un primo 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 e *Chiron Corporation*). Le proteine/peptidi verranno lasciate interagire in presenza e assenza di CD4 solubile per mimare il complesso di entrata e esporre il V3 loop nel contesto dell'Env. Esperimenti di competizione con peptidi corrispondenti a varie regioni di Env e 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. Alcuni esperimenti saranno volti a determinare il ruolo degli eparan solfati nella formazione del complesso Tat-Env. Infatti, sia Tat che il V3 loop legano reversibilmente gli eparan solfati, che potrebbero agire quale lattice in grado di stabilizzare modifiche conformazionali dell'Env, e "guidare" le interazioni tra Tat e il V3 loop stesso. Infine, cellule T verranno esposte a anticorpi o ligandi per 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 molecolare di varianti virali in scimmie vaccinate e infettate con virus chimerici SIV/HIV

Nell'ambito di protocolli vaccinali basati sulla proteina TAT o di un plasmide contenente TAT 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, derivante dall'espansione in *Macaca fascicularis* del virus chimerico SHIV-89.6P. Tale virus si è dimostrato altamente patogenico in *Macaca fascicularis*. Infatti, il virus causa una massiva deplezione delle cellule CD4+ circolanti entro quattro settimane dall'inoculo, causando una immunodeficienza irreversibile negli animali infetti. Il genoma dello SHIV89.6Pcy243 è stato interamente sequenziato e confrontato al virus isolato da scimmie infette inserite in diversi protocolli sperimentali. I risultati indicano che la sequenza del gene *tat* di HIV-1 è conservata, pertanto la proteina TAT risulta essere un antigene non-polimorfico utilizzabile per l'immunizzazione. Al contrario, il sequenziamento del gene *env*, ha rivelato mutazioni della porzione citoplasmatica che potrebbero avere un importante ruolo patogenetico nella replicazione del virus.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione molecolare delle varianti virali del virus SHIV89.6Pcy243:

Clonaggio ed espressione dei mutanti del virus SHIV89.6Pcy243.

Identificazione dei determinanti genetici di aumentata patogenicità del virus SHIV89.6Pcy243 rispetto al virus SHIV-89.6P.

Studio della variabilità del gene *tat* del virus SHIV89.6Pcy243 in scimmie vaccinate con la proteina TAT non protette dall'infezione.

Poiché è stato dimostrato che la variabilità virale dipende dalla via d'ingresso del virus, obiettivo di questo studio è valutare la possibile insorgenza di varianti del gene *tat* durante la fase acuta e cronica dell'infezione dopo *challenge* mucosale con SHIV89.6Pcy243.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi porteranno ad una migliore comprensione delle interazioni molecolari alla base dei meccanismi di patogenesi virale, nonché all'identificazione di epitopi virali *target* in quanto essenziali per la replicazione dell'HIV-1. Tali informazioni saranno fondamentali per l'allestimento di nuove strategie terapeutiche e, soprattutto, per lo sviluppo di un vaccino di seconda generazione 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. Recentemente abbiamo inoltre osservato un effetto di Tat extracellulare sul mantenimento (espansione?) dei linfociti CD8 memoria diretti contro antigeni di HIV. Tat, tuttavia, non viene internalizzata dai linfo-monociti, probabilmente a causa della mancata espressione/attivazione delle integrine che ne mediano il legame, il signaling e l'internalizzazione. *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 estendere le osservazioni relative alla presenza di Tat sugli endoteli mediante analisi immunostochimica per Tat, Gag (p24), CD31 e marcatori di attivazione (ICAM, VCAM). Un secondo obiettivo è valutare l'infezione da HIV in cellule endoteliali vascolari e linfatiche in coltura. Infatti, l'analisi immunostochimica ha rivelato l'assenza di produzione di p24 negli endoteli, ma non è possibile escludere che gli endoteli attivati vengano infettati abortivamente e siano sede di attiva produzione di Tat intra ed extra cellulare. Un terzo obiettivo consiste nell'analisi dei meccanismi di trasferimento di molecole di superficie tra endoteli e linfo-monociti e, in particolare, delle integrine che mediano

l'internalizzazione e il *signaling* di Tat. Inoltre, intendiamo analizzare l'internalizzazione e il *signaling* di Tat extracellulare (e di complessi Tat/Env) in linfociti e monociti coltivati singolarmente o co-coltivati con cellule endoteliali attivate e non attivate, e gli effetti sull'attivazione, il *survival* e la proliferazione di queste cellule. Infine, verrà valutato l'effetto della co-cultura 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. Simili esperimenti verranno anche effettuati con linfomonociti migranti attraverso monostrati di cellule endoteliali (attivate e non attivate) coltivate su supporti porosi.

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 delle cellule dendritiche trattate con Tat sull'attivazione linfocitaria e sulla suscettibilità dei linfociti all'infezione virale

La proteina Tat di HIV prodotta nelle fasi iniziali dell'infezione e viene rilasciata nell'ambiente extracellulare ed esercita azioni chiave sulle cellule circostanti. Tat, in particolare, è in grado di aumentare l'espressione dei co-recettori CXCR4 e CCR5 nei linfociti e monociti del sangue periferico, aumentandone la suscettibilità all'infezione da parte di ceppi di HIV-1 X4- e R5-tropici. Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che Tat entra selettivamente in cellule dendritiche di origine monocitaria (MDDC) a dosi nano/picomolari, ed è in grado di indurre la maturazione e di aumentare la capacità di presentazione antigenica e la produzione di citochine e chemochine da parte di queste cellule. È ipotizzabile, perciò, che Tat possa esercitare un effetto di attivazione sulle cellule del sistema immunitario, aumentando in tal modo l'efficienza della replicazione virale. In questo contesto, sono stati avviati studi volti a valutare la capacità da parte di MDDC, trattate con Tat nativo e biologicamente attivo o con un mutante nella regione cisteinica (cys22 Tat) privo della capacità di transattivazione, di modificare lo stato di attivazione e la proliferazione di linfociti autologhi. Particolare interesse sarà rivolto alle variazioni dell'espressione di marcatori di attivazione (HLA-DR, CD69, CD25), di citochine Th1 e Th2, di beta-chemochine e, in particolare, al profilo trascrizionale linfocitario usando sistemi di analisi basati su *microarray*. Un altro punto importante della ricerca è valutare la suscettibilità dei linfociti co-coltivati con MDDC trattate con Tat all'infezione da parte di ceppi HIV-1 R5- o X4-tropici.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione della capacità di MDDC trattate con Tat biologicamente attivo, di indurre attivazione e produzione di citochine Th1 e Th2 nei linfociti (mediante sistemi di co-cultura mista autologa).

Determinazione della capacità di MDDC trattate con Tat biologicamente attivo di indurre proliferazione e/o modificazioni del ciclo cellulare nei linfociti.

Determinazione della capacità di MDDC trattate con Tat biologicamente attivo di indurre modificazioni nello stato funzionale dei linfociti e correlazione con gli effetti di attivazione e proliferazione linfocitaria.

Studio della suscettibilità di linfociti T stimolati con MDDC trattate con Tat biologicamente attivo all'infezione *in vitro* da parte di ceppi di HIV-1 R5- o X4-tropici difettivi per la replicazione, e correlazione con lo stato di attivazione cellulare.

Trasferibilità dei risultati

Oggi sono a disposizione numerosi farmaci in grado di controllare la replicazione di HIV e rallentare la progressione della malattia. Tuttavia, la tossicità e le farmacoresistenze associate ai trattamenti attualmente impiegati limitano l'efficacia delle terapie disponibili. Vi è perciò l'urgente necessità e una grande domanda di nuovi farmaci e nuove approcci preventivi e terapeutici contro HIV/AIDS. Lo studio del ruolo della proteina Tat nella suscettibilità dei linfociti all'infezione, particolarmente in relazione all'interazione di questa proteina con le cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche), alla attivazione del sistema immunitario, e agli effetti sul tropismo virale, aprirà nuove prospettive per l'identificazione di nuovi target terapeutici e nuovi approcci vaccinali.

Immunopatogenesi dell'infezione da HIV nei Paesi in via di sviluppo

La risposta immune a qualsiasi agente patogeno è caratterizzata da un'estrema variabilità individuale. Nell'infezione da HIV è noto che la progressione della malattia fortemente influenzata oltre che dalle caratteristiche di patogenicità del virus, anche e soprattutto da fattori dell'ospite e da fattori ambientali. La maggior parte delle nostre conoscenze in questo campo deriva da studi effettuati su individui infettati da HIV che vivono in paesi sviluppati. Ben poco ancora si conosce delle caratteristiche dell'infezione da HIV in individui che vivono in Paesi in via di sviluppo. In particolare, sono ancora da chiarire il ruolo delle co-infezioni, incluse le malattie virali, batteriche e parassitarie, e l'influenza di fattori ambientali, quali la malnutrizione, nella progressione dell'infezione.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale è lo studio del profilo immunologico di pazienti infettati da HIV che vivono in Paesi in via di sviluppo, in paragone a quello di pazienti infettati che vivono nel mondo occidentale.

Lo studio si effettua su pazienti a differenti stadi della malattia, con differenti conte di cellule T CD4+ e diversa carica virale, trattati o non con farmaci antiretrovirali. Vengono valutati e messi tra loro in correlazione differenti parametri e *marker* virali, immunologici e ambientali, quali: 1) parametri virologici, quali la carica virale e la presenza/assenza di mutazioni di resistenza ai farmaci antiretrovirali; 2) parametri immunologici, quali il numero delle cellule T CD4+, il genotipo HLA (*low e/o high resolution*), la risposta anticorpale a differenti antigeni di HIV, inclusa la valutazione degli epitopi riconosciuti, la risposta cellulo-mediata tramite EliSpot per: gamma-IFN, IL-2, IL-4, perforina, granzyme, le Ig totali e singole classi di Ig, e la risposta naturale antivirale 3) fattori ambientali, quali la malnutrizione e la presenza di co-infezioni da parte di virus, batteri e parassiti.

Trasferibilità dei risultati

Dati di letteratura dimostrano che la regolazione della risposta immune umorale e cellulare gioca un ruolo fondamentale nel controllo della progressione dell'infezione da HIV. La maggior parte delle informazioni in letteratura sul ruolo della risposta immunitaria ad HIV nel controllo dell'infezione si riferisce a studi condotti in individui del mondo sviluppato. Se si considera che nei Paesi in via di sviluppo, e in particolare nell'Africa sub-sahariana, l'infezione da HIV/AIDS è la causa principale di morte con un numero medio di individui deceduti nell'anno 2004 pari a circa 2.3 milioni, la necessità di effettuare in loco studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi immunitari coinvolti nella differente suscettibilità all'infezione da HIV, nonché alla progressione in AIDS, risulta evidente. Inoltre, le conoscenze scientifiche derivanti da un'indagine di questo tipo sono essenziali per l'ottimizzazione di terapie farmacologiche individuali volte a ridurre gli effetti secondari su pazienti non trattati, e per lo sviluppo di strategie preventive, incluso lo sviluppo di un vaccino.

Incidenza dell'infezione 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 diverse specie di scimmie (macachi, babuini) indigene di diverse aree geografiche (Africa, Asia sud-orientale). Gli SRV sono stati identificati come gli agenti eziologici di fibromatosi sia retroperitoneale (RF) che cutanea originando lesioni simili a quelle descritte per il Sarcoma di Kaposi, e di immunodeficienza in diverse specie di macachi simile a quella indotta dal virus della immunodeficienza acquisita nell'uomo (HIV-1) o nella scimmia (SIV). Gli SRV sono retrovirus non 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). Evidenze dell'infezione da SRV sono state già osservate nell'uomo (donatori di sangue, omosessuali, tossicodipendenti, linfoma di Burkitt, pazienti con AIDS e con linfoma B, schizofrenici). Dunque, SRV può infettare l'uomo ed è verosimile che l'infezione originariamente sia stata ristretta a certe regioni geografiche dell'Africa occidentale, dell'India e dell'Asia sud-orientale dove sia per contatti sia 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 considerazioni, ci proponiamo i seguenti obiettivi:

Isolare SRV e approntare metodologie molecolari e immunologiche per rilevare infezioni da SRV.

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).

Valutare la presenza e il ruolo delle co-infezioni virali (HIV-1, -2, HTLV, EBV).

Trasferibilità dei risultati

I risultati finali attesi, contribuiranno ad una più approfondita conoscenza della diffusione della infezione da SRV in Italia e delle patologie potenzialmente associate a tale infezione. I risultati ottenuti da tale studio ci permetteranno di approntare protocolli di interventi di immuno-profilassi e terapia, che se dimostrati efficaci nel modello preclinico, possono essere di facile applicabilità all'uomo.

Internalizzazione di complessi Tat/Env in cellule dendritiche, macrofagi e cellule endoteliali

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 e efficientemente internalizzata tramite le integrine avb3, a5b1 e avb5 da cellule dendritiche, macrofagi e cellule endoteliali attivate. Queste sono le principali cellule presentanti l'antigene (e i primi *target* di HIV) presenti alla porta d'entrata del virus. La formazione di un complesso molecolare tra Tat e Env potrebbe modificare il *pathway* di internalizzazione di HIV in queste cellule e, perciò, la loro suscettibilità e/o permissività all'infezione. Inoltre, Tat potrebbe modificare il *trafficking* dei virioni internalizzati, il processamento degli antigeni virali e,

quindi, il priming del sistema immune al virus. 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

Il primo risultato di questo progetto è chiarire gli effetti dell'interazione Tat/V3 *loop* nell'internalizzazione di Env e di HIV in cellule dendritiche mature e immature, in macrofagi, e in cellule endoteliali attivate e non attivate. A questo scopo, peptidi lineari e ciclici corrispondenti al V3 *loop* e molecole monomeriche e trimeriche di Env verranno incubate con quantità crescenti di Tat o di un mutante di Tat privo di capacità transattivante (Tatcys22). I complessi Tat/V3 *loop* o Tat/Env verranno addizionati alle cellule e la loro internalizzazione sarà monitorata al FACS e al microscopio confocale mediante reazione con anticorpi specifici. Esperimenti di blocco dei recettori per Env (CD4, co-recettori di HIV, DC-*sign*, recettore del mannosio) e delle integrine α 5 β 3, α 5 β 1 e α 5 β 5 chiariranno il *pathway* di internalizzazione dei complessi. Esperimenti simili verranno effettuati con particelle virali vuote (VLP) fluorescenti esprimenti o no l'Env di HIV e con particelle virali infettanti. Un altro risultato chiave consiste nel chiarire gli effetti dell'interazione Tat/Env nell'infezione di queste cellule con HIV. Cellule dendritiche, macrofagi e 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. Il ruolo del complesso Tat/Env nel processamento degli antigeni verrà analizzato mediante priming di linfociti con cellule dendritiche pulsate con particelle virali o molecole Env complessate o meno con Tat o Tatcys22, e *ex vivo* mediante esperimenti di stimolazione con il complesso utilizzando PBMC di soggetti infettati da HIV.

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.

Le gap junctions degli endoteli: nuovi bersagli per terapie

Vasculogenesi e angiogenesi sono modulate da attivatori e inibitori naturali che inviano alle cellule endoteliali segnali di sopravvivenza, crescita, migrazione e differenziamento. Ciò richiede l'integrazione di queste funzioni tra le cellule endoteliali attraverso vie di comunicazione intercellulare. Una di queste vie è mediata da *gap junctions* (GJ) e connesine (Cxs). Le GJ, costituite dall'assemblaggio di 6 molecole di Cxs, sono siti di comunicazione diretta tra cellule adiacenti che permettono il passaggio di molecole quali ioni, secondi messaggeri e molecole "segnale". Durante la formazione di nuovi vasi, fattori angiogenici (quali il bFGF) aumentano l'espressione di Cxs, o inducono la sintesi di nuove GJ nelle cellule endoteliali. Ciò suggerisce che la vasculogenesi e la neoangiogenesi necessitino dell'espressione di specifiche Cxs, come indicato dall'elevata l'espressione di Cxs negli endoteliali dei vasi in formazione nell'embrione. In questo contesto è noto che le cellule endoteliali esprimono Cxs (Cx37, Cx40 e Cx43) che mediano le comunicazioni tra le cellule endoteliali durante lo sviluppo e/o il mantenimento dei vasi. Infatti, topi *knock-out* per Cx37 e Cx40 mostrano anomalie dei vasi, emorragie e morte perinatale. Questi dati suggeriscono che l'inibizione delle GJ endoteliali possa bloccare la neoangiogenesi associata ai tumori.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto ha come scopo l'analisi della regolazione delle GJ nell'angiogenesi e nei tumori. I principali risultati attesi sono i seguenti: 1) identificazione delle GJ espresse in colture primarie di cellule endoteliali attivate o meno con citochine infiammatorie, fattori angiogenici, e/o trattate con inibitori dell'angiogenesi; 2) analisi delle alterazioni delle GJ endoteliali nei vasi di tumori sperimentali indotti mediante l'inoculo di cellule tumorali in topi nudi. A questo scopo, le GJ indotte nelle cellule endoteliali dai fattori prodotti dalle cellule tumorali saranno confrontate con quelle indotte dai fattori angiogenici e con quelle espresse dalle cellule endoteliali non stimulate; 3) infine, verifica dell'effetto di anticorpi anti-connessine sull'angiogenesi e sulla progressione neoplastica in modelli murini.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenibili sono trasferibili alla pratica clinica in quanto: i) le GJ e Cxs potrebbero essere impiegate in diagnostica come marcatori di angiogenesi e progressione neoplastica; ii) l'identificazione di antagonisti delle Cxs porteranno allo sviluppo di terapie innovative contro l'angiogenesi e i tumori.

Network Europeo per la prevenzione dell'HIV/AIDS (EAPN)

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 una strategia di prevenzione efficace, 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. Tuttavia, non esiste alcuna piattaforma volta alla integrazione di tali programmi in una unica azione coordinata, aspetto critico per il potenziamento e l'implementazione dei processi relativi allo sviluppo di nuove strategie preventive. Il network di eccellenza europeo per la prevenzione dell'HIV/AIDS (*European HIV/AIDS Prevention Network – EAPN*) ha lo scopo di coinvolgere gruppi di ricerca europei altamente qualificati allo scopo di costituire una organizzazione volta a potenziare la ricerca di base mirata allo sviluppo di vaccini e microbici, la selezione dei migliori candidati, la loro valutazione preclinica e la realizzazione di sperimentazioni cliniche di Fase I e II. Il CNAIDS è attivamente coinvolto nelle attività dell'EAPN in quanto coordinatore del progetto AVIP (*AIDS Vaccine Integrated Project*) finanziato dall'Unione Europea.

Risultati attesi nel triennio

Le attività che si intende realizzare nell'ambito della EAPN saranno mirate al raggiungimento dei seguenti obiettivi: a) promuovere e coordinare lo sviluppo di nuovi candidati vaccinali e microbici in Europa; b) sostenere la validazione dei nuovi candidati nei modelli preclinici al fine di costituire le basi necessarie alla realizzazione della sperimentazione clinica di Fase I e II di tali candidati; c) promuovere la diffusione di nuove acquisizioni scientifiche a vantaggio delle attività di ricerca mirate allo sviluppo di nuovi candidati vaccinali. Tali obiettivi saranno realizzati attraverso le seguenti attività:

Creazione di una Vaccine Discovery Task Force in Europa

Creazione di un "portafoglio vaccini" europeo

Armonizzazione del programma europeo per lo sviluppo di vaccini contro l'HIV

Creazione di un programma di ricerca congiunto per lo sviluppo di vaccini in Europa

Sviluppo di un piano di comunicazione volto a implementare il programma di scambio e integrazione nella comunità scientifica, e la realizzazione delle attività di *technology transfer* e *capacity building*.

Trasferibilità dei risultati

L'EAPN opererà sulla base dei progetti di ricerca in corso nell'ambito della Unione Europea, al fine di permetterne una maggiore integrazione, con particolare riferimento alle procedure di armonizzazione e standardizzazione delle attività realizzate nell'ambito di tali progetti (ricerca di base, studi preclinici, sperimentazioni cliniche). L'EAPN potrà quindi rappresentare una controparte importante nell'ambito delle analoghe iniziative realizzate a livello mondiale, quali la *Global HIV/AIDS Vaccine Enterprise* (GHAVE) e la *European Developing Countries Clinical Trial Partnership* (ECTP).

Patogenesi di malattie linfoproliferative in modelli animali di scimmia e coniglio: ruolo di cofattori virali (SIV, HIV, EBV) associati o non ad immunodeficienza

L'infezione con SIV o con HIV nella scimmia o nell'uomo, induce una attivazione policlonale delle cellule B, ipergammaglobulinemia, interruzione dei segnali di cooperazione tra cellule B e T e infine immunodeficienza. L'aumento di linfomi non Hodgkin (NHL) in pazienti infettati con HIV è descritto in letteratura e l'analisi prospettica indica che tale frequenza è destinata ad aumentare proporzionalmente all'aumento del tempo medio di vita dei pazienti. I linfomi NHL sono una classe eterogenea di malattie linfoproliferative, con un diverso spettro d'aggressività, la cui insorgenza può essere influenzata dallo stato del sistema immune dell'ospite. La presenza di EBV e di lesioni genetiche è stata associata all'insorgenza di linfomi B o T e di altre neoplasie nell'uomo. La patogenesi dei NHL, come anche le possibili correlazioni tra (co)-infezioni virali e processo linfomagenico, sono tuttavia ancora da chiarire. Un'aumentata incidenza di linfomi associati ad infezione con herpesvirus della *Macaca fascicularis*-1 (HVMF-1), simile all'infezione con EBV nell'uomo, è stata osservata in scimmie *cynomolgus* infettate con SIV. Abbiamo dimostrato che SIV i) è presente in cellule tumorali di linfomi oligoclonali con fenotipo B e T, originati in scimmie infettate e ii) induce un'infezione cronica non citolitica in cellule B di scimmia latentemente infettate con EBV-like. A tale infezione è associata una upregolazione di CD23 e CD40 ma non riattivazione di EBV-like. Questi dati ci suggeriscono dunque che SIV può avere un ruolo nel processo linfomagenico. Più recentemente, un nuovo herpesvirus B linfotropico, omologo ad EBV umano, è stato da noi isolato da una linea linfoblastoide derivata da linfoma B extranodale di *Macaca fascicularis* (EBV-cy). EBV-cy infetta e trasforma *in vitro* cellule B di scimmia e induce linfomi nel modello preclinico del coniglio.

Risultati attesi nel triennio

In questo contesto, la disponibilità di modelli *in vitro* e di modelli preclinici ci permette di:

Studiare la patogenesi dei NHL associati all'infezione con SIV/SHIV e/o con EBV-cy. Intendiamo i) studiare *in vitro* gli effetti dell'infezione con SIV o virus chimerici SIV/HIV (SHIV) o di geni regolatori (Tat e Nef) wild-type o mutati su colture primarie o tumorali di cellule di scimmia, (riattivazione di EBV-cy, espressione di bcl-2, bcl-6, p53, c-myc, attività telomerasica, apoptosi); ii) studiare gli effetti dell'infezione con EBVcy su cellule dendritiche (maturazione, differenziamento, *uptake* e presentazione di antigeni) e sulla loro suscettibilità all'infezione con SIV o SHIV; iii) valutare gli effetti di EBV-cy in scimmie già cronicamente infettate con SIV o SHIV.

Sviluppare modelli preclinici (primati non umani e coniglio) di infezione con EBV-like. Ci proponiamo di: i) allestire un protocollo di infezione mucosale con EBV-cy e ii) studiare la cinetica della replicazione virale e le modificazioni dei parametri emato-clinici e immunologici.

Approntare approcci preventivi e terapeutici antitumorale in presenza di IL-15. Prevediamo di: i) inoculare nel coniglio *naive* o infettato corpi apoptotici (cellule omologhe trasformate con EBV-cy indotte in apoptosi) o reinfondere le cellule dendritiche omologhe pulsate *in vitro* con

antigeni tumorali; b) preparare vettori vaccinali (plasmidici o virali o batterici) esprimenti EBNA2, LMP1 e EBNA 3-A, -B,-C, di EBV-cy; c) studiare *in vitro* e *in vivo* gli effetti immunomodulatori e antivirali di IL-15.

I risultati attesi sono: 1) una più approfondita conoscenza delle interazioni di SIV o SHIV e EBV-cy e individuazione di possibili cofattori (virali), di lesioni genetiche e di markers tumorali; 2) definizione di una metodologia diagnostica per lo studio del riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline e di oncogeni (c-myc, bcl-2, bcl-6, p53), e di tecniche immunologiche per la identificazione *in vivo* dei *marker* prognostici della linfomagenesi (*marker* di superficie, citochine, chemochine plasmatiche, genomica, proteomica); 3) standardizzazione di modelli preclinici di infezione con EBV-cy e 4) possibilità di valutare nei modelli preclinici l'efficacia di interventi preventivi e terapeutici contro EBV e tumori associati

Trasferibilità dei risultati

La disponibilità di modelli preclinici e in particolare del modello del primate non umano, filogeneticamente vicino all'uomo, è di fondamentale importanza in quanto ci offre la possibilità di studiare la patogenesi dell'infezione e le diverse fasi del processo neoplastico possibilmente associati a virus (SIV, SHIV, EBV-cy) omologhi a virus (HIV, EBV) presenti nell'uomo. Inoltre, qualsiasi intervento o preventivo o terapeutico (antivirale e antitumorale) se dimostrato efficace nel modello animale di *Macaca fascicularis* potrà essere facilmente trasferito in campo clinico.

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;

Confronto tra vaccini di composizione e formulazione diverse per l'identificazione dei candidati vaccinali più promettenti da sviluppare e valutare in futuri *trial* clinici;

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 e 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 *naive*.

Determinazione degli effetti di Tat extracellulare sulla capacità di neutralizzazione di sieri di primati infettati/vaccinati e di soggetti infettati/vaccinati.

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 delle proteine regolatorie di HIV-1 sulla replicazione e patogenesi virale

Le proteine regolatorie di HIV-1 svolgono un ruolo fondamentale nell'insorgenza dell'AIDS. Tra queste, Nef costituisce un fattore patogenetico anche in relazione ai suoi effetti su monociti e macrofagi. In particolare, l'espressione di Nef nei macrofagi induce un alterato rilascio di chemochine e citochine con azioni pro-infiammatorie. A causa di questi effetti, i macrofagi esprimenti Nef sono in grado di attivare linfociti quiescenti, rendendoli pronti alla replicazione di HIV. In questo contesto, abbiamo recentemente dimostrato che Nef inibisce il rilascio di radicali liberi da parte dei macrofagi. Il nostro gruppo ha inoltre avviato una serie di esperimenti finalizzati allo studio dell'interazione tra Nef e esosomi. Gli esosomi sono vescicole rilasciate da cellule dendritiche, linfociti B e T, reticolociti, cellule epiteliali intestinali e cellule tumorali che veicolano proteine all'esterno della cellula. Esosomi derivati da cellule dendritiche immature, ad esempio, contengono molecole MHC di classe I e II, CD86, tetraspanine, e integrine. I nostri studi indicano che Nef entra a far parte degli esosomi derivati da cellule dendritiche immature e da linfociti T. Quindi, scopo del presente progetto è di analizzare le conseguenze funzionali del trasporto di Nef negli esosomi. Ciò potrebbe chiarire parte degli effetti patogenetici indotti da Nef, nonché contribuire alla comprensione del ruolo degli esosomi nelle funzioni del sistema immunitario.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione dei fattori solubili coinvolti nell'attivazione dei linfociti mediata da cellule monocitico-macrofagiche esprimenti Nef;

determinazione del meccanismo d'azione alla base dell'inibizione del rilascio di radicali liberi indotto da Nef nei macrofagi;

determinazione degli effetti di Nef sulla composizione degli esosomi derivati da cellule dendritiche e da cellule T;

stabilire se Nef può essere trasferito per mezzo degli esosomi, e le relative conseguenze sia dal punto di vista immunologico che virologico;

determinazione degli effetti degli esosomi prodotti in presenza di Nef in modelli murini.

Trasferibilità dei risultati

I meccanismi molecolari alla base degli effetti di Nef sull'infettività virale e sulla patogenesi AIDS sono ancora in gran parte da chiarire. I risultati della presente attività di ricerca chiariranno i meccanismi alla base del potenziamento dell'infettività e della patogenicità di HIV da parte di Nef. In particolare, l'individuazione dei fattori solubili attivanti i linfociti indotti da Nef nei monociti-macrofagi aprirà la strada ad approcci terapeutici basati su anticorpi/antagonisti di detti fattori solubili.

Ruolo di proteine precoci Tat e Nef di HIV-1 nella infezione primaria e trasmissione dell'infezione

Le mucose costituiscono una larga parte della superficie corporea e rappresentano la prima linea di contatto e di difesa contro diversi patogeni incluso HIV. Sebbene le cellule mucosali non rappresentino il *target* ideale, tuttavia HIV è trasmesso anche per via mucosale. La grande massa di conoscenze sulla patogenesi di HIV, in modo particolare a livello mucosale, è stata prodotta da osservazioni su pazienti a tempi tardivi dall'infezione. Gli eventi precoci nelle interazioni virus-cellula ospite alla porta di infezione, sono critici per la propagazione dell'infezione. La conoscenza di questi meccanismi è di fondamentale importanza per ampliare le conoscenze patogenetiche necessarie allo sviluppo di nuovi approcci preventivi o terapeutici contro HIV/AIDS.

Tat e Nef di HIV sono proteine espresse in tempi precoci dopo l'infezione, sono rilasciate nel mezzo extracellulare e oltre al loro ruolo nel ciclo virale, inducono numerosi effetti biologici su cellule di diversa origine. Tat e Nef possono anche interagire direttamente con il virus tramite legami con i componenti dell'envelope virale e modificare il meccanismo di infezione in cellule non altrimenti suscettibili. Infatti, nostri dati *in vitro* indicano che Tat di HIV (per Nef rimane ancora da dimostrare) attraverso la associazione con Env non solo facilita l'infezione ma induce anche modificazioni del tropismo virale. Possiamo quindi ipotizzare che Tat e Nef di HIV, attraverso molteplici meccanismi quali interazioni con Env, selezione di varianti virali, modulazione delle risposte immuni innate e adottive, possono esercitare un ruolo fondamentale nella trasmissione mucosale dell'infezione e quindi nella disseminazione del virus. Con il presente progetto ci proponiamo di studiare il ruolo di Tat e Nef di HIV e i meccanismi patogenetici dell'infezione mucosale. A questo scopo saranno utilizzati sia sistemi *in vitro* ivi compreso anche colture di tessuti mucosali che il modello preclinico del primate non umano. Al raggiungimento di questi obiettivi concorre una rete di collaborazioni nazionali e internazionali (Italia, Francia, Germania, USA) costituita da gruppi di elevata esperienza e qualificazione scientifica.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si articola nelle seguenti fasi:

Valutare il ruolo di Tat e di Nef di HIV-1 i) sulla infezione di cellule mucosali (epiteliali, dendritiche, endoteliali, monociti/macrofagi) e sulla modulazione del tropismo virale; ii) sulla capacità di attrarre cellule e di attivarle.

Valutare il ruolo di Tat e di Nef di HIV-1 nella disregolazione del sistema immune con particolare riguardo a: i) rilascio di radicali liberi; ii) rilascio di microvescicole pro-apoptotiche e il loro effetto su cellule dendritiche (DC) e sulla attivazione di cellule CD4+ e CD8+; iii) modulazione dell'immunoproteasoma indotta da Tat o Nef e le conseguenze sul rilevamento di epitomi antigenici (es. CTL) altrimenti criptici.

Studiare il meccanismo della trasmissione virale utilizzando sistemi *in vitro* di coltura di tessuti umani: i) coculture di enterociti e DC; ii) cellule endometriali; iii) cellule umane (endocervice, ectocervice e cellule epiteliali vaginali), colture di tessuto vaginale epiteliale

(VEC). I supernatanti di cellule trattate con Tat e Nef od infettate con HIV saranno utilizzati per determinare la presenza di citochine e chemochine e il loro effetto su DC e sulla suscettibilità all'infezione di cellule *target*.

Studiare le interazioni virus-ospite nel modello animale del primate non umano, dopo esposizione mucosale di virus chimerico SIV/HIV esprimente proteine Tat e Nef di HIV1. A brevi intervalli dall'esposizione virale, le scimmie saranno sacrificate per determinare 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 e iii) e modificazioni dell'immunoarchitettura tissutale sia locale che distale.

Il raggiungimento degli obiettivi ci permetterà di conoscere il ruolo di Tat e Nef nella infezione primaria e i meccanismi patogenetici associati. Conseguentemente, tali informazioni saranno di grande rilevanza per approntare interventi sia preventivi che terapeutici (es, microbici) contro HIV/AIDS.

Trasferibilità dei risultati

La conoscenza dei meccanismi patogenetici che governano la trasmissione dell'infezione e il ruolo che in tale ambito esercitano due fondamentali geni regolatori di HIV (Tat e Nef) saranno di fondamentale importanza per il disegno di interventi preventivi o terapeutici (microbici ad es.) contro HIV/AIDS. Inoltre il fatto che si utilizzano insieme virus esprimente proteine Tat e Nef di HIV-1 e primati filogeneticamente vicini all'uomo, assicurano la piena e veloce trasferibilità di applicazione in campo sanitario.

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

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. In particolare, studieremo se il Tat nella forma solubile o immobilizzata aumenta l'efficienza di infezione di cellule epiteliali, dendritiche e monociti/macrofagi, e se è in grado di modulare il tropismo virale. Studieremo, inoltre, l'effetto di Tat extracellulare sull'infettività di diversi ceppi virali X4- o R5-tropici. Il dominio minimo di Tat extracellulare in grado di mediare l'infezione cellulare verrà identificato mediante peptidi corrispondenti alle varie regioni di Tat. I nostri dati preliminari hanno inoltre evidenziato la capacità del Tat extracellulare di interagire con l'*envelope* virale favorendo così il processo di trasmissione virale. Cercheremo 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, e è presente a livello dei vasi di pazienti infetti, è probabile che mediante questo meccanismo, la proteina faciliti 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*

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 che avessero come scopo primario lo sviluppo di un'immunità 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 5 immunizzazioni (0, 4, 8, 12, 16 settimane) per via sottocutanea (con adiuvante), o per via intradermica (senza adiuvante), con 3 differenti dosi vaccinali (7.5, 15 e 30 microgrammi).

Risultati attesi nel triennio

Tutti i volontari arruolati (20 per il protocollo preventivo e 27 per il protocollo terapeutico) hanno ricevuto le cinque immunizzazioni previste dai protocolli clinici, completando la fase di trattamento (24 settimane). I risultati interinali relativi alla fase di trattamento indicano che il vaccino è sicuro e immunogenico avendo indotto sia anticorpi che risposte cellulari specifiche, confermando il pieno raggiungimento degli obiettivi prefissati. Si è quindi avviata la fase di *follow-up*, che si protrarrà per ulteriori 2 anni, nel corso della quale saranno effettuate le seguenti valutazioni:

A) 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.

B) Immunogenicità: valutazione della risposta umorale anti-Tat specifica (titolazione e epitope *mapping* di IgM, IgG e IgA anti-Tat, *cloning* e caratterizzazione di cellule B specifiche); valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat; valutazione della risposta cellulare anti-Tat specifica [proliferazione, produzione di gamma-IFN (Elispot) e produzione di IL4 (Elispot) in risposta al Tat, *cloning* e caratterizzazione di cellule T specifiche]

Trasferibilità dei risultati

I risultati relativi alla fase 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, che coinvolgerà migliaia di volontari sieronegativi a rischio di infezione (vaccinazione preventiva) e volontari sieropositivi (vaccinazione terapeutica) in differenti stadi di progressione della malattia e sottoposti a differenti regimi terapeutici.

Sperimentazione clinica di Fase I (preventiva e terapeutica) 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 e Env, con particolare riferimento a 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/Chiron. I singoli componenti di tale vaccino combinato sono stati già testati in *trial* clinici di Fase I sponsorizzati dall'ISS (Tat) e dalla Chiron (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 un *trial* clinico di fase I 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 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 dalla 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 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 di studi preclinici realizzati nel modello della scimmia, indicanti la sicurezza, immunogenicità ed efficacia di tale approccio vaccinale, l'ISS ha condotto una sperimentazione clinica di Fase I sia su soggetti sieronegativi (vaccinazione preventiva) che su individui già infettati da HIV (vaccinazione terapeutica). I risultati ottenuti al termine delle cinque immunizzazioni previste dalla fase di trattamento indicano il pieno raggiungimento degli obiettivi primario (sicurezza) e secondario (immunogenicità) dello studio. Si intende quindi sviluppare ulteriormente il programma di sperimentazione clinica, con l'obiettivo di sviluppare nuove formulazioni vaccinali volte ad ottenere una maggiore stabilità dell'immunogeno e 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 della 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 II (preventiva e 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 gioca 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 ragionevole e dei risultati ottenuti nei modelli preclinici, l'ISS ha condotto trial clinici di Fase I, in doppio cieco, randomizzati e controllati con *placebo*, con la proteina Tat, sia su soggetti HIV sieronegativi (vaccinazione preventiva) che su individui HIV sieropositivi (vaccinazione terapeutica) allo scopo di dimostrare la sicurezza e l'immunogenicità della proteina Tat. I volontari arruolati (20 per il protocollo preventivo e 27 per il protocollo terapeutico) hanno ricevuto 5 immunizzazioni (0, 4, 8, 12, 16 settimane) per via sottocutanea (con adiuvante), o per via intradermica (senza adiuvante), con 3 differenti dosi vaccinali (7.5, 15 e 30 microgrammi). I risultati ottenuti indicano che il vaccino è sicuro e immunogenico avendo indotto risposte umorali e cellulari specifiche, confermando il pieno raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di tali risultati si procederà alla sperimentazione clinica di Fase II 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 Sud Africa per la vaccinazione preventiva (finanziamento del Ministero degli Affari Esteri).

Saranno effettuate valutazioni di sicurezza e immunogenicità: a) monitoraggio clinico e di parametri ematologici, biochimici e immunologici (includendo per il protocollo terapeutico il monitoraggio delle cellule CD4+ circolanti e della viremia plasmatica); b) valutazione della risposta umorale anti-Tat specifica (titolazione e 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 della sicurezza e dell'immunogenicità del vaccino Tat su migliaia di individui 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.

Strategie innovative per la deplezione selettiva di cellule infette da HIV

Lo scopo della presente attività di ricerca è di approntare una strategia terapeutica innovativa in grado di colpire selettivamente i *reservoirs* dell'infezione di HIV generalmente resistenti alla terapia antiretrovirale. Questa strategia si basa sull'uso di particelle lentivirali "vuote", vale a dire prive di materiale genomico (Virus-like particles, VLPs), in grado di incorporare alti livelli

dell'enzima Timidina Chinasi dell'*Herpes Simplex Virus-1* (HSV-TK) come prodotto di fusione con la proteina Nef, sfruttando la capacità di Nef di incorporarsi nelle particelle lentivirali. In proposito, nel nostro laboratorio abbiamo recentemente individuato un mutante di Nef (Nef7) in grado di inserirsi nei virioni con una efficienza circa 100 volte maggiore della controparte *wild-type*. L'idea alla base della presente attività si fonda sulla possibilità di indirizzare specificatamente le Nef7/TK-VLPs su cellule esponenti HIV in modo tale che la cellula venga indotta al "suicidio" per trattamento del profarmaco Ganciclovir. Le Nef7/TK-VLPs verranno veicolate specificatamente contro le cellule infette per mezzo dell'inclusione nell'*envelope* virale dei recettori cellulari per l'HIV (CD4 e CXCR4 o CCR5). Questi, a seguito del legame specifico sulla membrana delle cellule esponenti i prodotti Env di HIV, provocheranno la fusione virus-cellula, inducendo così il rilascio di Nef7-TK nel citoplasma della cellula bersaglio (fusione inversa). In definitiva, le Nef7/TK-VLPs potranno contribuire alla distruzione selettiva dei reservoirs di cellule persistentemente infette resistenti alla HAART, contribuendo così alla eradicazione di HIV. È importante sottolineare che l'efficacia terapeutica di tali particelle virali, seppur basandosi sulle tecnologie relative alla produzione dei vettori lentivirali, non richiede alcun trasferimento genico, a differenza delle terapie antitumorali basate sul sistema HSV-TK/Ganciclovir finora sviluppate.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi che ci proponiamo con la presente attività possono così riassumersi:

produzione e caratterizzazione molecolare e biologica di Nef7/TK-VLPs aventi come recettori CD4 e CXCR4 o CCR5;

valutazione della funzionalità di dette VLPs in *test in vitro*, quali analisi della mortalità cellulare a seguito del trattamento sia di cellule cronicamente infette con HIV che di colture monocitico-macrofagiche da donatori sani infettate acutamente;

valutazione dell'efficacia del trattamento con Nef7/TK-VLPs in colture *ex vivo* di linfociti da soggetti sieropositivi;

studio approfondito del meccanismo d'azione sotteso alla morte cellulare indotta in cellule quiescenti e replicanti trattate con Nef7/TK-VLPs e coltivate in presenza di Ganciclovir;

in collaborazione con Molme, industria biotecnologica all'avanguardia per la produzione e il controllo di vettori retro- e lentivirali con la quale i proponenti hanno in corso diverse collaborazioni, si passerà a una produzione in larga scala di Nef7/TK-VLPs nella prospettiva di avviare una sperimentazione pre-clinica del prodotto.

Trasferibilità dei risultati

Una volta verificata la sua efficacia e specificità d'azione, il prodotto Nef7/TK-VLPs potrà avere una trasferibilità ampia a livello terapeutico. In particolare, un eventuale successo a livello delle indagini in vitro aprirebbe le porte alla necessità di produrre quantità di VLPs per gli studi pre-clinici che verranno sviluppati in collaborazione con industrie biotec. Risulta inoltre evidente che, essendo lo scopo ultimo e principale del presente progetto la produzione di un reagente biologico utile per la distruzione selettiva di cellule esponenti HIV, il buon esito del presente progetto di ricerca si risolverebbe in una immediata ricaduta positiva in termini di nuovi approcci terapeutici anti-HIV. È da sottolineare infine che l'uso dei virosomi a base retro- e lentivirale è stato già da noi proposto per la protezione brevettuale. Quindi, il CNAIDS potrà possederne la proprietà intellettuale per il loro sviluppo e utilizzo terapeutico.

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, i risultati di queste attività richiedono un costante monitoraggio per valutarne l'impatto sui *trends* 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 Centro Nazionale AIDS 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 a 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.

In futuro questi studi saranno svolti anche in altri paesi dell'area subsahariana (Uganda, Tanzania, Zanzibar e Kenia) e asiatica (Tailandia e Cina).

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 e 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 preliminari alla 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: 1) monitorare la prevalenza dell'infezione da HIV in Paesi in via di sviluppo e stimarne l'incidenza, 2) valutare la distribuzione dei ceppi e dei ricombinanti di HIV, 3) studiare la capacità del sistema immune di individui infettati da HIV di riconoscere in modo "crociato" i possibili candidati vaccinali. I Paesi attualmente inclusi nello studio sono il Sudafrica, lo Swaziland e l'Uganda, ma si prevede di includere nel prossimo futuro altri paesi della regione sub-sahariana (Tanzania, Zanzibar, Kenia), dell'Asia (Cina) e dell'Est asiatico (Tailandia). Un ulteriore obiettivo è il trasferimento della tecnologia al personale locale, e il suo *training* per le attività connesse ai futuri *trial* clinici vaccinali.

L'attività di base, propedeutica alla sperimentazione, consiste 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 viene effettuato, a definite scadenze, utilizzando i *kit* commerciali di riferimento che ogni paese adotta; la stima di incidenza viene effettuata 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* vengono 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 di parte di cellule del sangue periferico stimulate con l'antigene vaccinale. La variabilità virale viene studiata sottotipizzando, sia sierologicamente che tramite sequenziamento, il ceppo virale infettante.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi descritti sono fondamentali per valutare la possibilità di eseguire i futuri *trial* clinici vaccinali 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 preparatori immunologici, virologici e clinici mirati allo sviluppo e sperimentazione di vaccini contro l'HIV/AIDS in popolazioni di immigranti provenienti da Paesi in via di sviluppo

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. Il Centro per le malattie della migrazione (Centro di

Riferimento ed Eccellenza per l'assistenza alle popolazioni di immigrati) operante presso l'Ospedale S. Gallicano, svolge da anni attività clinica e sociosanitaria, inclusa la formazione di mediatori socio-culturali, diretta alle popolazioni di immigrati presenti nel nostro Paese, che rappresentano troppo spesso una condizione socio sanitaria particolarmente vulnerabile anche sul piano infettivologico. Seppur residenti in Italia, i cittadini immigrati richiedono 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 che per la realizzazione delle misurazioni immunologiche necessarie alla sperimentazione di candidati vaccinali. Peraltro, le popolazioni immigrate offrono, su un piano sociale, clinico e biologico, un importante e peculiare osservatorio verso i relativi paesi di provenienza e possono quindi fornire elementi altrimenti acquisibili solo con studi sul campo.

Risultati attesi nel triennio

Ci si propone l'allestimento di studi preparatori immunologici e virologici mirati allo sviluppo e sperimentazione clinica di vaccini contro l'HIV/AIDS basati sulla proteina Tat in popolazioni di immigrati da Paesi in via di sviluppo. In particolare, verranno realizzate le seguenti attività:

- definizione dei parametri laboratoristici di *routine* (sierologia HIV-1, ematologia, biochimica, valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie, viremia plasmatica);

- determinazione dell'aplotipo HLA;

- valutazione della risposta immune naturale e adattativa contro proteine regolatorie (Tat, Rev, Nef) e/o strutturali (Gag, Env) dell'HIV-1, allestita come segue: a) immunità umorale (determinazione e titolazione di IgG, IgA and IgM specifiche, mappatura degli epitopi B-cellulari, valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi identificati); b) Immunità cellulo-mediata (risposta linfoproliferativa, determinazione della risposta CTL, mappatura degli epitopi T-cellulari); c) Immunità naturale (analisi della produzione di chemochine e alpha-defensine, determinazione dell'attività NK).

Trasferibilità dei risultati

Le attività allestite forniscono un contributo originale e diversificato allo sviluppo e messa a punto di un vaccino contro l'HIV/AIDS nell'ambito di programmi multicentrici coordinati dall'ISS sia in ambito nazionale (*Italian Concerted Action on Vaccine Development - ICAV*) che Europeo (*AIDS Vaccine Integrated Project - AVIP*). Entrambi i programmi sono coordinati dal CNAIDS e sono specificamente proiettati a costituire le basi per lo sviluppo di programmi vaccinali nei Paesi in via di sviluppo.

Studi sulla dinamica dell'insorgenza di varianti virali in popolazioni di Paesi in via di sviluppo

L'infezione da HIV è particolarmente diffusa nell'Africa sub-sahariana. In quasi tutta l'area geografica, la tipologia del territorio, la scarsità di mezzi e di risorse e gli alti costi dei presidi medici hanno reso molto difficile l'introduzione della terapia antiretrovirale (HAART) su larga scala. Negli ultimi anni, grazie al supporto del *Global Fund*, sono stati avviati programmi per l'identificazione e il trattamento con farmaci antiretrovirali di pazienti infettati da HIV particolarmente bisognosi. Tali programmi si realizzano attraverso strutture sanitarie quali il *Voluntary Counselling and Testing (VCT)* e gli *Health Centers*. Grossi ostacoli si incontrano soprattutto nell'organizzare le modalità del monitoraggio dell'efficacia della terapia e dell'aderenza al trattamento da parte del paziente. L'attuazione di adeguate strategie per superare questo problema è urgente per evitare l'insorgenza di varianti virali di resistenza che

possano da una parte far fallire la terapia nel paziente e, dall'altra, diffondersi rapidamente nella popolazione.

In questo quadro, risulta quindi importante eseguire studi per caratterizzare la dinamica dell'insorgenza di nuove varianti del virus HIV nella popolazione.

Risultati attesi nel triennio

Dati di letteratura dimostrano che l'introduzione di un trattamento farmacologico in nicchie di popolazione determina l'insorgenza di nuove varianti resistenti al trattamento in conseguenza della pressione selettiva del farmaco. Con il presente studio ci si propone di caratterizzare l'insieme delle varianti di HIV-1 circolanti in popolazioni di Paesi in via di sviluppo, nelle quali il trattamento con farmaci antiretrovirali è ora disponibile. Tale indagine viene condotta su pazienti HIV+, sottoposti o non a trattamento HAART, ad intervalli di tempo regolari. L'RNA virale verrà estratto dal plasma e la regione del *gene pol* e quella codificante per la porzione C2-V3 della gp120 sequenziate per sottotipizzare il virus e per verificare la presenza di mutazioni di resistenza. L'esecuzione regolare di tali indagini permetterà da una parte di valutare se e con quale frequenza compariranno, nella popolazione degli individui non trattati, varianti di resistenza al trattamento e, dall'altra, fornirà dati utili per monitorare la comparsa di resistenze negli individui trattati.

Trasferibilità dei risultati

Il contenimento dell'infezione da HIV, che ha assunto le caratteristiche di una vera e propria pandemia nei Paesi in via di sviluppo, è basato attualmente sulla prevenzione e sul trattamento con farmaci antiretrovirali. Pertanto, monitorare l'efficacia della terapia è di fondamentale importanza. I risultati derivanti dal presente studio, amplieranno le conoscenze relative agli effetti della terapia sulla variabilità e sulla fitness virale. In particolare, la conoscenza della rapidità di insorgenza delle varianti e le caratteristiche di farmacoresistenza delle stesse, permetterebbe una gestione più adeguata del trattamento farmacologico, garantendo così un più efficiente contenimento dell'infezione.

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 a 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 *debulking* 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 cellulose-mediate ad HHV8, un virus oncogeno associato alla patogenesi del sarcoma di Kaposi).

Trasferibilità dei risultati

Lo studio consentirà di trasferire al Servizio Sanitario Nazionale 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 aspetti genetici nella progressione dell'infezione da HIV in pazienti da Paesi in via di sviluppo: ruolo della regione polimorfica dei geni della catena pesante delle immunoglobuline

La regione 3' regolatoria della catena pesante delle Immunoglobuline (Ig) svolge un ruolo essenziale nella regolazione della risposta immune anticorpale. Tale regione è infatti coinvolta sia nella maturazione dei linfociti B, sia nella produzione di classi specifiche di Immunoglobuline. Attualmente, sono stati identificati nell'uomo tre differenti *enhancers* che costituiscono un unico complesso. L'*enhancer* centrale del complesso, denominato HS1,2 risulta polimorfico, e i quattro alleli fino ad ora identificati hanno una frequenza diversa in differenti popolazioni del mondo industrializzato. In alcuni paesi africani, si è osservata una bassa prevalenza dell'allele *2, che sembra sia collegata a un'alta frequenza di malattie immunitarie sistemiche. Altri dati di letteratura dimostrano l'esistenza di una correlazione fra la frequenza di alleli specifici, la variabilità della risposta immunitaria, e differenti malattie autoimmuni.

Nel campo dell'HIV/AIDS, la risposta anticorpale verso gli antigeni HIV gioca certamente un ruolo nel controllo della progressione della malattia. Nelle popolazioni dei Paesi in via di sviluppo l'infezione da HIV sembra progredire più velocemente e, in molti casi, più severamente di quanto accada nei paesi sviluppati. Ciò potrebbe essere dovuto a una incrementata risposta di tipo Th-2, in seguito alle ricorrenti infezioni di tipo parassitario. È

perciò di grande rilevanza lo studio del ruolo degli alleli della regione regolatoria della catena pesante delle Immunoglobuline nelle popolazioni dei Paesi in via di sviluppo.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo del progetto è lo studio del ruolo degli alleli della regione *enhancer* delle Immunoglobuline nella progressione dell'AIDS. Verranno implementati studi per caratterizzare il polimorfismo di questa regione regolatoria nella popolazione africana e per stabilire eventuali associazioni tra gli alleli riscontrati e la risposta anticorpale specifica per HIV in individui africani infettati dal virus e a diversi stadi della malattia, con differenti numeri di cellule T CD4+ e diversa carica virale.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi possono dare un rilevante contributo alla conoscenza dei meccanismi patogenetici dell'infezione da HIV e allo studio e al disegno di vaccini contro l'HIV/AIDS.

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 e 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 dalla induzione di citochine e chemochine associate a una 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 tetanico) *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 immunoregatorie 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

Molti sono ancora gli aspetti da elucidare inerenti le attività di Tat su cellule dendritiche. In particolare, sono in corso studi per identificare le interazioni esatte tra Tat e i molteplici recettori per Tat presenti sulle cellule dendritiche. Un altro aspetto rilevante concerne i meccanismi di internalizzazione e gli effetti di maturazione/attivazione esercitati da Tat. Studi preliminari nei quali sono stati comparati gli effetti di Tat e di Tatcys22 suggeriscono che gli effetti sulle MDDCs non siano unicamente dovuti alla trasduzione del segnale attivato dal legame con i recettori di membrana, e che l'attività transattivante di Tat sia necessaria. Restano da chiarire gli aspetti molecolari di questi fenomeni che saranno uno degli obiettivi per il prossimo triennio. In particolare si intende 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.

Nulla è noto sugli effetti di Tat su cellule dendritiche plasmocitoidi (pDCs), note per essere le principali produttrici di IFN-alpha e che, pertanto, svolgono un'importante azione antivirale e

immunomodulatoria. Pertanto, ci si propone di verificare gli effetti di Tat su queste cellule mediante approcci analoghi a quelli già menzionati. Infine un obiettivo del tutto nuovo è quello di 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 del tropismo di specie di HIV-1 e SIV in *Macaca Fascicularis*: infezione *in vitro* di linfociti da sangue periferico e di cellule B stabilizzate

Lo spettro d'ospite dei retrovirus è determinato da fattori cellulari e virali che regolano l'infezione. Lo studio dei fattori di restrizione che proteggono le cellule dalle infezioni retrovirali è orientato a capire se tali molecole possano essere utilizzate (manipolate) a scopo terapeutico, e se modelli animali quali topo e scimmia possono essere ingegnerizzati ad esprimere tali molecole, rendendoli quindi adatti a supportare l'infezione da HIV-1. In vitro, la replicazione di HIV-1 è ristretta a cellule umane e di alcuni primati. Recentemente è stato dimostrato che il maggiore fattore di restrizione in cellule di scimmia contro l'infezione di HIV-1 è il TRIM5a. 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. Questi dati, indicano, quindi, che nelle cellule F6 il fattore di restrizione TRIM5a sia inattivo o non espresso. 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 preceentemente in letteratura. Le cellule F6, inoltre, si infettano con i virus HXBc2 e 89.6 ma non con virus M-tropici e T-tropici primari. Infine abbiamo dimostrato che le cellule F6 sono infettabili con il virus macrofago-tropico SIVmac 316 ma che non sono in grado di supportare l'infezione del virus T-tropico SIVmac239. Le altre F6 rappresentano, quindi, un ottimo modello per studiare il tropismo di HIV e SIV.

Risultati attesi nel triennio

Ci si propone di determinare quali siano i fattori cellulari e/o virali che causano la restrizione di tropismo dell'HIV-1 in primati non umani avvalendosi di un modello d'infezione HIV-1 nella linea cellulare F6 di scimmia. Ci proponiamo quindi: a) di verificare se il TRIM5a sia implicato nella restrizione della replicazione virale nelle cellule F6; b) caratterizzare e sequenziare l'HIV-1 prodotto dalle cellule F6 cronicamente infette; c) determinare le basi molecolari della restrizione della replicazione del SIVmac239. I risultati di questo studio contribuiranno a identificare a) fattori di restrizione virali per la replicazione dell'HIV-1 b) i fattori cellulari che mediano la resistenza o la permissività all'infezione di HIV-1 e di altri lentivirus e c) più in generale, a migliorare la comprensione della patogenesi di HIV-1.

Trasferibilità dei risultati

I risultati derivanti da questi studi saranno fondamentali per l'allestimento di nuove strategie terapeutiche e vaccinali contro l'infezione da HIV-1 e per il loro trasferimento nella pratica clinica.

Studio dell'espressione di HLA-G in individui africani infettati da HIV

L'HLA-G è una molecola MHC di classe Ib. Il suo profilo di espressione *in vivo* è molto ristretto, essendo limitato quasi esclusivamente alle cellule del trofoblasto placentare. È stato dimostrato che l'HLA-G svolge un importante ruolo immunoregolatorio: 1) inibendo la citotossicità mediata da cellule NK e cellule T CD8+, 2) inibendo la proliferazione allogenica di cellule T CD4+, 3) inducendo lo sviluppo di cellule presentanti l'antigene (APC) tollerogeniche. In età adulta, l'HLA-G è espressa in cellule di tessuti trapiantati e tumorali, durante l'infezione da HCMV e HIV, e, più in generale, nel corso di patologie infiammatorie. Nell'infezione da HIV è stata osservata induzione dell'espressione di HLA-G in monociti e linfociti e, in Africa, è stata dimostrata una correlazione tra la presenza di varianti di HLA-G e HLA-E e una ridotta suscettibilità all'infezione con HIV. Il presente progetto è volto a studiare il ruolo patogenetico dell'HLA-G nell'infezione da HIV in individui africani, i quali sono ulteriormente esposti a condizioni di immunoattivazione indotta dal contesto ambientale.

Risultati attesi nel triennio

L'espressione di molecole di HLA-G sarà studiata tramite immunofluorescenza e analisi al FACS in linfociti e monociti di individui africani infettati con HIV e paragonata a quella di individui residenti in paesi sviluppati. Il livello di espressione verrà correlato al livello di risposta immune sia anticorpale (presenza e titolo di anticorpi specifici per gli antigeni di HIV), sia cellulo-mediata (produzione di citochine specifiche dopo stimolazione di leucociti con peptidi di antigeni di HIV).

L'espressione dei *marker* di HLA-G verrà inoltre correlata allo stadio della malattia e alla variante infettante. Infine, verrà valutata la co-espressione di varianti di HLA-G e HLA-E in individui africani a differenti stadi della malattia, a lenta progressione, e in non infetti, ma con comportamenti a rischio di infezione.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio si propone di indagare il ruolo dell'espressione dei *marker* HLA-G sulla superficie delle cellule di individui africani per studiare i meccanismi di resistenza o di controllo dell'infezione da HIV. In un ambito come quello africano, in cui la progressione in AIDS risulta essere più rapida e la sintomatologia più severa, tali studi acquistano particolare importanza per chiarire i meccanismi alla base dei diversi quadri patologici e di progressione della malattia.

Studio dell'immunità nativa e adattativa cellulare 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 allogenica o ad antigeni di richiamo. 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 Centro Nazionale AIDS 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. Fra questi, i primati non umani rivestono un'importanza particolare, perché sono gli unici nei quali è possibile riprodurre la malattia

mediante infezione con l'omologo SIV o con virus chimerici SIV/HIV (SHIV) e, pertanto, studiare sia aspetti patogenetici che di efficacia vaccinale.

Risultati attesi nel triennio

Allo scopo di ottenere informazioni rilevanti dagli studi di patogenesi e di vaccinazione sarà necessario sviluppare e standardizzare una molteplicità di metodiche atte a misurare parametri di immunità naturale e acquisita, sia a livello sistemico che mucosale. In particolare si tratterà di valutare l'attività di adjuvanza di Tat su vari tipi cellulari, sia *in vitro* che *ex vivo*. L'impiego di *microarray* per l'analisi del trascrittoma e studi proteomica consentiranno di meglio definire le modalità e gli effetti di questa adjuvanza a livello di immunità naturale (citochine infiammatorie e soppressore, chemochine, fattori anti- e pro-apoptotici, IFNs e proteine del ciclo cellulare, ecc.) e adattativa. Un approccio simile verrà utilizzato per la caratterizzazione della risposta dell'ospite, vaccinato o *naive*, all'infezione virale. Lo scopo è l'identificazione di *pattern* distinti di espressione di geni dell'immunità innata e adattativa in scimmie che controllano o meno l'infezione virale, spontaneamente o dopo vaccinazione, al fine di poterli indurre in corso di vaccinazione e dopo *challenge*.

Grande spazio verrà dato a metodiche citofluorimetriche per la misurazione multiparametrica di fattori solubili, per lo studio fenotipico e funzionale di tipi cellulari mediante l'associazione della fenotipizzazione con *marker* di linea, di attivazione e di stadio differenziativi, per l'espressione di citochine mediante colorazione intracitoplasmatica, e all'utilizzo di CFSE per misurare la risposta proliferativa a vari stimoli. Negli studi di patogenesi e vaccinali sarà inoltre importante 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.

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.

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 Progressors, LTNP*) diretto ad identificare correlati di protezione immunologica

L'identificazione di correlati di protezione immunologica in corso di infezione e/o esposizione naturale all'HIV 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 Progressors, 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 programmati 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, diretta sia contro prodotti di geni regolatori che strutturali dello HIV-1. Il complesso di tali studi potrà contribuire a identificare nuovi bersagli di intervento immuno-

terapeutico, incluso l'allestimento di nuove strategie vaccinali. Tali studi saranno realizzati 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

Appropriati criteri di reclutamento verranno applicati al fine di minimizzare l'influsso di variabili quali età, sesso, fattori di rischio per l'infezione da HIV, assetto genetico (HLA). 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 includerà un'analisi prospettica della risposta immune anti-virale sia naturale che specifica (umorale e cellulare).

In particolare, la valutazione della risposta immune naturale e adattativa contro proteine regolatorie (Tat, Rev, Nef) e/o strutturali (Gag, Env) dell'HIV-1 verrà allestita come segue:

Immunità umorale (determinazione e titolazione di IgG, IgA and IgM specifiche, mappatura degli epitopi B-cellulari, valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi identificati, clonaggio e caratterizzazione di cellule B specifiche, *microarray*)

Immunità cellulo-mediata (risposta linfoproliferativa, determinazione della risposta CTL, mappatura degli epitopi T cellulari, clonaggio e caratterizzazione di cellule T specifiche, *microarray*)

Immunità naturale (analisi della produzione di chemochine e alpha-defensine, determinazione dell'attività NK).

Campioni di plasma, siero, saliva e cellule mononucleate del sangue periferico verranno sottoposti a conservazione criogenica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio possono offrire nuove e originali informazioni utili non solo all'identificazione di correlati di protezione, ma anche alla determinazione di possibili marcatori di progressione clinica in pazienti con infezione da HIV-1 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.

Sviluppo di nuovi immunogeni basati sul complesso Tat/Env

Nostri studi recenti hanno indicato che la proteina Tat di HIV è in grado di rendere suscettibili all'infezione cellule esprimenti livelli sub-ottimali dei co-recettori per il virus grazie alla capacità di legare il V3 loop di Env e di mimare, almeno in parte il complesso di *entry* di HIV. Ciò ha aperto la possibilità di utilizzare complessi molecolari tra Tat e Env allo scopo di indurre risposte immuni in grado di prevenire queste azioni di Tat e di neutralizzare l'infettività virale. Lo sviluppo di un nuovo immunogeno costituito dal complesso Tat/V3 *loop* e/o Tat/Env e la sua/loro caratterizzazione *in vitro* rappresentano il punto di partenza di tale attività di ricerca. Tali studi saranno completati dalla valutazione *in vivo* della innocuità, immunogenicità ed efficacia di varie formulazioni e protocolli vaccinali basati sul complesso. Saranno impiegati a tale scopo modelli animali di vaccinazione e/o infezione per procedere poi alla sperimentazione umana. Criteri per la scelta di una formulazione/protocollo vaccinale saranno, fra gli altri, l'induzione di risposte anticorpali e cellulari contro il vaccino. Questi studi vengono attuati nell'ambito dello STREP europeo "Very Innovative AIDS Vaccine" (VIIV). Il progetto sarà ufficialmente completato nel 2006 e, sulla base dei risultati ottenuti, si prevedono attività di ricerca aggiuntive durante il successivo biennio 2007-2008 per l'ulteriore caratterizzazione e valutazione *in vitro* e *in vivo* del vaccino combinato.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale di questi studi è lo sviluppo di nuovi immunogeni basati sulla combinazione di Tat e Env o frammenti derivati da Env che, oltre a generare risposte cellulomediante contro l'HIV, siano in grado di indurre anticorpi neutralizzanti ad ampio spettro per la prevenzione dell'infezione da HIV e/o dell'AIDS. Si prevede che gli anticorpi generati siano specifici per il complesso proteico e/o per epitopi criptici o conservati che risultino accessibili su Env in seguito al legame con Tat, oltre a riconoscere le singole proteine che costituiscono il complesso stesso.

Tale obiettivo sarà perseguito attraverso l'espletamento delle seguenti attività:

- Generazione e caratterizzazione bioinformatica, chimico-fisica, immunologica e biologica del complesso Tat/Env o Tat/frammenti di Env
- Formulazione di complessi Tat/Env per la valutazione *in vitro* e *in vivo* del vaccino
- Valutazione preclinica della innocuità, immunogenicità e efficacia di varie formulazioni e protocolli vaccinali basati sul complesso Tat/Env in modelli animali di vaccinazione e/o infezione, quali topo, coniglio e scimmia per procedere poi alla sperimentazione clinica nell'uomo.
- Caratterizzazione delle risposte cellulari indotte dal vaccino
- Caratterizzazione delle risposte anticorpali generate dal vaccino, inclusi studi di “*epitope mapping*”, misurazione dei titoli di anticorpi neutralizzanti, e determinazione dello spettro d'azione di tali anticorpi mediante saggi di neutralizzazione contro ceppi virali di sottotipi diversi da quello utilizzato per la vaccinazione
- Produzione GMP di prodotti vaccinali selezionati

Trasferibilità dei risultati

L'attività di ricerca descritta sopra contribuirà direttamente alla ricerca per un vaccino contro l'HIV/AIDS in termini di sviluppo di prodotti vaccinali innovativi e, mediante la caratterizzazione del complesso Tat/Env (potenzialmente rilevante nell'infezione naturale da HIV), e fornirà nuove conoscenze sulla biologia del virus. È anche previsto il coinvolgimento dell'industria per la produzione GMP del vaccino sviluppato nell'ambito di questo progetto, sia per la sperimentazione clinica nell'uomo sia per il rapido e efficace trasferimento dei risultati ottenuti alla popolazione generale.

Sviluppo di sistemi innovativi di veicolazione di principi attivi a scopo terapeutico e vaccinale

Il Centro Nazionale AIDS si propone di sviluppare nuovi vaccini contro l'HIV/AIDS caratterizzati da elevata sicurezza ed efficacia e in grado di indurre risposte immunitarie durevoli sia a livello mucosale che sistemico. A questo scopo, in collaborazione con le Università di Ferrara, Bologna, Padova, Alessandria, con il CNR, con industrie *biotech* italiane ed estere (Austria), nonché con Centri di ricerca internazionali (Germania, Sudafrica), il Centro sta sviluppando una nuova piattaforma tecnologica basata sull'uso di micro- e nanoparticelle biocompatibili, involucri (*ghosts*) batterici e virosomi per la veicolazione di antigeni proteici o acidi nucleici. In particolare, sia le micro/nanoparticelle che i *ghosts* batterici possono essere caricati sulla propria superficie (nel primo caso) o al proprio interno sia con antigeni che con acidi nucleici e passivamente internalizzati dalle cellule. L'utilizzo dei virosomi modificati, basati su un sistema di *anchoring* mediato dal un mutante della proteina Nef di HIV-1 messo a punto nei laboratori del Centro Nazionale AIDS è, al contrario, una strategia atta a veicolare antigeni desiderati specificatamente in cellule bersaglio grazie alla possibilità di pseudotipizzare il virosoma con recettori specifici. Con questi metodi innovativi si potranno intraprendere nuove strategie vaccinali contro infezioni, quali quelle indotte da HIV, HCV o HPV, o contro tumori

potenzialmente sensibili alla risposta immunitaria dell'ospite. Tutti i su descritti sistemi di veicolazione hanno inoltre la caratteristica di aumentare la stabilità dell'immunogeno e preservarne l'attività biologica.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi della presente ricerca si possono così sintetizzare:

sviluppo e caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei diversi sistemi di veicolazione;
valutazione comparata mediante saggi *in vitro* dell'efficienza dei diversi sistemi di veicolazione in termini di induzione dell'attivazione di linfociti a seguito dell'assorbimento dell'antigene vaccinale da parte di cellule dendritiche;

valutazione comparata dell'efficienza dei diversi sistemi di veicolazione mediante studi pre-clinici in modelli di piccoli animali (topi, conigli);

valutazione comparata dell'efficienza di diverse formulazioni vaccinali sia in piccoli animali che in primati. A questo proposito verranno testati sia singoli antigeni virali che relative combinazioni allo scopo di determinare quale formulazione può essere valutata come la più efficace per il trattamento preventivo o terapeutico di malattie virali, quali quelle indotte da HIV, HCV o HPV, o tumorali.

sperimentazione clinica di Fase I dei migliori candidati vaccinali e terapeutici, che fornirà i dati necessari per il passaggio dei prodotti dalla fase di sviluppo precompetitivo a quello competitivo.

Trasferibilità dei risultati

I nostri studi basati sullo sviluppo di micro/nanoparticelle, *ghosts* batterici e virosomi sono specificatamente concepiti per l'utilizzo in campo clinico. In particolare, essi presentano potenzialità di utilizzo sia in campo infettivologico, attraverso l'induzione di una potente risposta anti-virale, che oncologico, per mezzo o dell'induzione di immunità anti-tumorale o attraverso l'eliminazione selettiva di cellule tumorali. Queste tecnologie inoltre potranno generare vaccini di facile somministrazione (per esempio tramite aerosol), a basso costo, e potenzialmente utili per l'utilizzo nei Paesi in via di sviluppo. È da sottolineare che i sistemi di veicolazione in sviluppo sono stati già da noi proposti per la protezione brevettuale. Quindi, l'ISS potrà possederne la proprietà intellettuale per il loro sviluppo e utilizzo terapeutico.

Sviluppo di un vaccino preventivo o terapeutico contro l'infezione da HIV utilizzando Tat da solo od associato ad altre proteine o geni virali

Abbiamo già dimostrato che la proteina Tat di HIV biologicamente attiva somministrata per via sottocutanea o per via intradermica è in grado di controllare la replicazione virale in scimmie infettate con SHIV89.6P e di resistere a una successiva superinfezione con alte dosi di SHIV.

La proteina Tat si caratterizza non solo per il suo potere immunogenico, per la sua capacità di funzionare essa stessa da adiuvante e di indurre nell'ospite risposte di tipo Th1, ma anche per la sua capacità di interagire con Env.

È noto che al raggiungimento di un'efficace protezione dall'infezione concorrono sia una risposta immunitaria antivirale cellulo-mediata che una risposta anticorpale con forte attività neutralizzante e che tali risposte dovrebbero possedere la caratteristica di riconoscere il più ampio spettro possibili di sottotipi di HIV. D'altra parte l'efficacia di un approccio vaccinale dipende da numerosi fattori quali frequenza e numero delle immunizzazioni, via di somministrazione, adiuvante utilizzato, dose e tempo di rilascio dell'antigene vaccinale. Inoltre, pensando alla fattibilità di campagne di immunizzazione nell'individuo adulto o in età pediatrica, la facilità di produzione (che significa anche costi minori), di trasporto, di conservazione e di somministrazione sono requisiti essenziali per un suo successo. Al fine di

poter svolgere in modo esaustivo il progetto, già da tempo è stato creato un *network* di collaborazioni con gruppi nazionali e internazionali (Germania, Svezia, Finlandia, Francia, Regno Unito, USA, Sud Africa), di qualificata esperienza e livello scientifico.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto, già iniziato in alcune sue parti e incluso in diversi progetti (AVIP, Muvapre, VIAV, ICAV, accordo ISS-NIH, accordo ISS-Chiron), si articola come segue: 1) Studio della innocuità, immunogenicità e efficacia in modelli preclinici (topo e primate non umano) di Tat da solo o in combinazione con la proteina Env di HIV (o con altre proteine come ad es. Nef o Rev) che è delecto della regione ipervariabile V2 (D2 Env) e espone epitopi conservati coinvolti nel *binding* recettoriale presentando una immunogenicità diversa dal *wild-type*. 2) Studio degli effetti di Tat su a) modulazione delle risposte immunologiche (risposte umorali, cellulari, modificazione del proteasoma con esposizione di siti antigenici altrimenti criptici) verso l'altro antigene presente nella combinazione vaccinale; b) capacità di modulare la immunità innata e indurre risposte antivirali (CAF, defensine ecc). 3) Generazione di nuove formulazioni di antigeni vaccinali usando nuovi sistemi di *delivery* sia mucosali che sistemici e studio della loro adjuvanza: vettori vivi attenuati sia virali che batterici (ad es. Adenovirus, *Herpes Simplex* e *Salmonella*); adiuvanti mucosali (MALP-2, LT-K63 etc); particelle fisiche di sintesi (nanoparticelle microparticelle) capaci di mantenere intatte nel tempo le caratteristiche fisico-chimiche, anche a temperatura ambiente, delle molecole (DNA o proteine) adsorbite; particelle biologiche quali VLPs, *ghosts* batterici o ricombinanti; immunoadiuvanti (es. IL-15). 4) Sviluppo e standardizzazione di nuove tecnologie di monitoraggio delle risposte immuni nei modelli preclinici (analisi citofluorimetrica, di *marker* fenotipici e funzionali, proliferazione, genomica, proteomica ecc.). 5) sviluppo di modelli murini di efficacia che permettano una preselezione delle diverse candidati vaccinali e loro formulazioni.

Trasferibilità dei risultati

Il risultato finale del progetto nelle sue diverse articolazione è quello di generare un vaccino o una combinazione vaccinale che se dimostrata innocua, immunogenica ed efficace nel modello murino prima e nel modello del primate non umano poi, possa essere di facile trasferibilità all'uomo. Inoltre, lo studio nel primate non umano delle risposte immuni in corso di vaccinazione e dopo esposizione al virus, consentirà lo sviluppo di nuove metodologie di studio, che potranno, vista la prossimità filogenetica con l'uomo, generare nuovi standards facilmente applicabili nei *trial* clinici sia preventivi che terapeutici condotti non solo in Europa ma anche nei Paesi in via di sviluppo.

Sviluppo di virosomi per nuove strategie anti-tumorali

La presente attività di ricerca si propone di sviluppare nuove strategie per la eliminazione di cellule tumorali e per l'induzione di una immunità anti-tumorale, per mezzo di virosomi basati su retro- o lentivirus in grado di veicolare nelle cellule bersaglio antigeni/proteine a scopo preventivo e/o terapeutico. I virosomi da noi sviluppati sono basati su un innovativo sistema di *anchoring* mediato da un mutante della proteina Nef di HIV-1 (Nef7) isolato nel nostro laboratorio. In particolare, abbiamo già dimostrato che il mutante Nef7 viene incorporato nei virosomi con una efficienza circa 100 volte superiore rispetto al Nef *wild-type*, e questa caratteristica viene mantenuta anche se Nef7 è parte di un prodotto di fusione con proteine eterologhe. In particolare, per le strategie di immunizzazione anti-tumorale, verranno prodotti (e caratterizzati) virosomi contenenti i prodotti di fusione di Nef7 con antigeni di melanoma (MAGE-A3, MART-1), "pseudotipizzati" con il recettore del virus della stomatite vescicolare. Per quanto riguarda le strategie farmacologiche, abbiamo già dimostrato che cellule neoplastiche (glioma) trattate con virosomi contenenti il prodotto di fusione di Nef7 con il gene

della timidina chinasi di HSV-1 sono portate a morte in presenza di Ganciclovir. Verranno perciò prodotti (e caratterizzati) virosomi contenenti il prodotto di fusione Nef7/TK pseudotipizzati con il recettore del virus della linfocoriomeningite murina che è in grado di riconoscere selettivamente le cellule del glioma.

Risultati attesi nel triennio

Produzione e caratterizzazione di virosomi contenenti gli antigeni di melanoma MAGE-A3 o MART-1;

Produzione e caratterizzazione di virosomi contenenti il prodotto di fusione Nef7/TK, pseudotipizzati con il recettore del virus della linfocoriomeningite murina;

Saggi *in vitro* per valutare la capacità dei virosomi contenenti MAGE-A3 e MART-1 di indurre attivazione linfocitaria previa stimolazione con cellule dendritiche immature;

Valutazione *in vitro* dell'efficienza e specificità di riconoscimento dei virosomi da parte delle cellule di glioma;

Valutazione dell'efficienza dei virosomi nell'indurre immunità contro gli antigeni di melanoma in modelli murini.

Trasferibilità dei risultati

Una volta verificata la loro sicurezza, efficacia e specificità d'azione *in vitro* e nei modelli animali, i virosomi verranno trasferiti alla sperimentazione clinica. Ciò comporta la necessità di produrre la quantità di virosomi necessaria per gli studi pre-clinici, che dovranno essere sviluppati in collaborazione con l'industria. Ciò porterà a una ricaduta positiva in termini di nuovi approcci terapeutici contro i tumori. In questo contesto, l'uso dei virosomi basati su retro- e lentivirus è già oggetto di protezione brevettuale per il mantenimento delle proprietà intellettuali dei prodotti nel settore pubblico.

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 e a facilitare la comparazione di dati generati in centri diversi. Su queste premesse, si sintende realizzare una serie di attività dirette allo sviluppo, validazione e standardizzazione di nuove tecnologie di indagine immunologica, quali: a) elaborazione di procedure Operative Standard (SOP) per campionamento di materiale biologico, criopreservazione e trasporto; b) standardizzazione e validazione di *test* in citofluorimetria per determinazioni immunofenotipiche di base e avanzate; c) standardizzazione e validazione di *test* per la valutazione di risposte immuni T *Helper*; d) 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 citossica 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 immune 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 del primate non umano di un vaccino multiproteico contro HIV/AIDS nell'individuo adulto e in età pediatrica

Nel modello SIV-macaca sono stati sperimentati diversi approcci vaccinali, basati su antigeni virali strutturali o regolatori, da soli o in parziale combinazione. Benché siano stati ottenuti risultati significativi, il livello di protezione osservato risulta ancora parziale e comunque non soddisfacente. Alla luce di queste osservazioni, abbiamo ipotizzato che per essere efficace un vaccino anti-HIV/AIDS, dovesse essere il risultato di risposte immuni (umorali e cellulari) 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) somministrati per via sistemica e 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. Questi risultati sottolineano a) l'efficacia protettiva di un vaccino contenente un ampio spettro di antigeni virali, b) l'importanza del sistema di *delivery* basato sulla combinazione tripla di vettori che evitano risposte anti-vettore, c) la capacità protettiva di un vaccino dato per via sistemica verso un *challenge* dato per via mucosale.

Risultati attesi nel triennio

Come continuazione del precedente lavoro, al fine di valutare il grado e la durabilità della protezione indotta dalla precedente vaccinazione intendiamo procedere a un secondo *challenge* con virus eterologo somministrato per via mucosale e quindi monitorare le scimmie per le risposte immunologiche (umorali e cellulari) e per i livelli di replicazione virale.

Al fine di migliorare la immunogenicità (umorale e cellulare) e quindi aumentare l'efficacia protettiva del vaccino multiproteico sia nell'individuo adulto che in età pediatrica, utilizzando il modello preclinico del primate non umano, ci proponiamo di: a) ottimizzare l'espressione degli antigeni (SIV/HIV) eterologhi nei vettori vaccinali; b) studiare *in vitro* gli effetti della citochina immunomodulatoria (IL-15) sulla maturazione e funzione di cellule dendritiche di scimmie adulte e in età pediatrica; c) utilizzare *in vivo* IL-15 per espandere il *pool* di cellule memoria generate dagli antigeni vaccinali; d) valutare gli effetti di vettori (plasmidici, virali) e veicoli batterici (es. Salmonella attenuata) sulle cellule dendritiche; e) selezionare vettori virali es. (virus vaccinico attenuato, ceppo Ankara, virus attenuati Adenovirali) e/o veicoli batterici (es. Salmonella) sulla base della economicità di produzione, facilità di conservazione e trasporto, e della somministrazione atraumatica degli antigeni vaccinali.

Verificare quindi l'efficacia di sistemi di somministrazione (sistemica e/o mucosale) di antigeni vaccinali.

Stabilire procedure operative *standard* e preparare un piano di sviluppo dei prodotti per l'applicazione in *trial* clinici nell'adulto e in età pediatrica.

Trasferibilità dei risultati

Per la vicinanza filogenetica con l'uomo, il primate non umano rappresenta ad oggi il migliore modello preclinico per verificare la immunogenicità e 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.

Sviluppo, produzione, titolazione *in vitro* e *in vivo* di virus chimerici (SIV/HIV)

Il modello del primate non umano è correntemente utilizzato per studi di patogenesi e per la valutazione dell'efficacia di approcci vaccinali contro HIV-AIDS. Il modello animale ideale in cui HIV si replichi e induca le medesime manifestazioni cliniche di HIV nell'uomo a tutt'oggi non è ancora disponibile per cui sono utilizzati virus chimerici SIV/HIV (SHIV). Nei nostri approcci vaccinali utilizziamo antigeni di HIV (come ad es. Tat e Env) ed è quindi indispensabile utilizzare come virus per il *challenge* un virus chimerico che contenga i geni di interesse di HIV ma che al tempo stesso sia capace di infettare e replicare in scimmie *cynomolgus*. Già in passato virus chimerici SIV/HIV (SHIV89.6P, SHIVSF162P3 e SHIVSF162P4) contenenti anche geni Tat e Env di HIV, sono stato prodotti e utilizzati per infettare scimmie *cynomolgus*. Tuttavia, gli SHIV patogenici ad oggi disponibili o contengono solo parzialmente geni di HIV (Rev, Tat, Env) o contengono anche altri geni di HIV ma non sono patogenici nel modello animale. È importante sviluppare ulteriormente questi virus chimerici la cui composizione genica e patogenicità si avvicini a quella di HIV nell'uomo.

Nel "Reparto di retrovirologia Sperimentale e modelli di primati non umani" del Centro Nazionale AIDS esiste già una qualificata esperienza nel campo delle infezioni retrovirali e lentivirali *in vitro* e nel modello di *Macaca fascicularis*. Tale acquisita esperienza nel campo specifico può essere considerata una ottima base per lo sviluppo delle tematiche scientifiche illustrate nel presente progetto

Risultati attesi nel triennio

Alla luce di tali considerazioni intendiamo:

- Procedere alla produzione e titolazione *in vitro* e *in vivo* di SHIV attualmente disponibili e che sono essenziali per i nostri studi.
- Produrre e caratterizzare *in vitro* e *in vivo* un nuovo virus chimerico SIV/HIV che oltre a contenere Rev, Tat e Env contenga anche Nef di HIV.
- Infettare scimmie *cynomolgus* per la produzione e titolazione di nuovi SHIV.

I risultati finali attesi sono:

- disponibilità di SHIV a diverso tropismo titolati *in vitro* e *in vivo* su scimmie *cynomolgus*;
- disponibilità di un nuovo SHIV contenente Rev, Tat, Env e Nef di HIV competente per la replicazione in scimmie *cynomolgus*.

Trasferibilità dei risultati

La disponibilità di virus chimerici che contengano il più ampio spettro possibile di geni di HIV, permette di valutare nel modello preclinico l'efficacia di approcci sia vaccinali che terapeutici. I risultati così ottenuti dai trial preclinici di efficacia, possono essere direttamente trasferiti per l'applicazione in campo clinico sia in *trial* preventivi che terapeutici contro HIV/AIDS.

**Centro Nazionale AIDS
per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS**

Attività di controllo, valutazione, parere

Attività di supporto di consulenza e analisi di campioni di sangue per trasfusione

Il Reparto Infezioni da Retrovirus in Paesi in via di sviluppo è coinvolto in un'attività di consulenza e analisi di campioni di sangue per trasfusione da donatori occasionali e periodici, come attività di supporto al Centro Trasfusionale U.O.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale dell'Azienda Policlinico Umberto I. Lo *screening* dei donatori presso il Centro Trasfusionale viene effettuato di *routine* da personale del Centro Trasfusionale con rilevazione tramite *test* immunoenzimatico su piastra (Elisa) degli anticorpi anti-HIV. Il sangue dei donatori negativi per gli anticorpi anti-HIV viene regolarmente trasfuso, mentre ogni risultato positivo in Elisa determina l'automatica eliminazione della sacca di sangue derivata da quel donatore, che, di conseguenza, non viene utilizzata né per la trasfusione, né per l'ottenimento di derivati ematici. Allo scopo di dare una risposta certa della presenza o meno di infezione da HIV al donatore risultato positivo al *test* di *screening*, il Reparto del Centro Nazionale AIDS effettua saggi addizionali (*Western Blot*, RIBA, RIPA, PCR, ecc.) su campioni di siero o cellule del donatore inviati dal Centro Trasfusionale al Reparto, in modalità criptata in modo che il personale del Reparto non possa giungere all'identificazione del donatore, per la conferma di infezione da HIV. I risultati sono poi comunicati al Centro Trasfusionale in forma riservata e ufficiale tramite Posta.

Piano triennale

Nel prossimo triennio l'attività continuerà. Sono inoltre previste collaborazioni con il Centro Trasfusionale come fonte per l'approvvigionamento di campioni biologici necessari per attività di ricerca relative agli obiettivi strategici del reparto. Tali collaborazioni saranno, di volta in volta, concordate con il primario del Centro o con una persona responsabile identificata allo scopo. Potranno, infine, essere aperte nuove collaborazioni con altri Centri Trasfusionali o con Istituti che abbiano necessità di tale supporto.

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 a 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 e 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 Centro Nazionale AIDS 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.

Piano triennale

Nel prossimo triennio l'attività di controllo continuerà. Inoltre il Reparto Infezioni da Retrovirus nei Paesi in via di sviluppo si inserirà nel Programma Nazionale di Controllo di qualità per i saggi per la rilevazione di laboratorio dell'infezione da HIV presso i laboratori diagnostici italiani. Tale Programma, già in organizzazione in Istituto, rappresenta il mezzo disponibile all'Autorità Nazionale per conoscere e monitorare la qualità dei servizi prestati a livello periferico. Il Programma prevede la partecipazione a titolo volontario e riservato di laboratori operanti sul territorio nazionale e rappresenta un'opportunità per ogni laboratorio di effettuare una autovalutazione sulla qualità del proprio operato.

**Centro Nazionale
di Epidemiologia, Sorveglianza
e Promozione della Salute**

Attività di ricerca

Analisi spazio-temporale dei casi di Ipotiroidismo Congenito

L'ipotiroidismo congenito (IC) è la più frequente endocrinopatia dell'infanzia con un'incidenza media nel mondo di 1 caso: 3000-4000 nati vivi e di 1 caso:2710 nati vivi in Italia.

Il Registro Nazionale Italiano degli IC, istituito nel 1987, rappresenta un potente strumento di sorveglianza. La qualità e la numerosità delle informazioni in esso contenute hanno consentito di descrivere nel tempo le caratteristiche più rilevanti dei nuovi casi di IC e allo stesso tempo di formulare nuove ipotesi di ricerca per lo studio dell'eziologia dell'IC.

Il carattere sporadico dei casi fa pensare che le mutazioni descritte recentemente possono spiegare soltanto un numero limitato di casi e inoltre uno studio caso-controllo condotto dall'ISS ha suggerito un'origine multifattoriale dell'IC nella quale fattori genetici (elevata frequenza di malformazioni) e ambientali (carenza nutrizionale di iodio) giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della malattia.

In collaborazione con il Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze dell'ISS, i dati del registro verranno elaborati al fine di proseguire la sorveglianza dei nuovi casi di IC e di studiare fattori ambientali e non coinvolti nell'eziopatogenesi dell'IC.

Risultati attesi nel triennio

Parallelamente ad analisi di tipo descrittivo, si stimeranno i tassi di Incidenza dell'IC e i relativi intervalli di confidenza a livello regionale e provinciale utilizzando tutti i casi di Ipotiroidismo Congenito (IC) diagnosticati tramite lo *screening* neonatale. Con opportune tecniche di analisi verrà valutata la stagionalità del fenomeno.

Con riferimento alle esposizioni ambientali e in particolare alla carenza iodica ambientale si calcolerà l'incidenza di IC (casi di IC / nati vivi) in funzione della litoraneità dei comuni (classificazione ISTAT) e i risultati verranno presentati sotto forma di tabelle e rappresentazioni cartografiche. A tal fine verranno utilizzati sistemi informatici per l'elaborazione, l'integrazione e la visualizzazione di dati geograficamente riferiti al territorio. In particolare si utilizzeranno uno o più *software* che consentono di studiare l'associazione tra dati di tipo sanitario e dati geografici, essendo in grado di gestire in modo perfettamente integrato dati alfanumerici e vettoriali. Compatibilmente con la disponibilità delle informazioni relative ai dosaggi del TSH dei bambini sottoposti a *screening* in alcune regioni italiane sarà possibile descrivere e studiare dettagliatamente i valori medi e mediani osservati e stratificare gli stessi in base alle caratteristiche della madre (età, tipo di parto, settimana gestazionale) e del bambino (peso, sesso).

Trasferibilità dei risultati

I risultati che si raggiungeranno con questo progetto costituiranno un contributo per la conoscenza dell'eziopatogenesi dell'ipotiroidismo congenito e offriranno la possibilità di orientare nuovi studi mirati all'approfondimento dell'origine multifattoriale dell'ipotiroidismo congenito.

Ipotiroidismo Congenito e gemellarità

L'ipotiroidismo congenito (IC) è la più frequente patologia endocrino-metabolica dell'infanzia. L'incidenza media in Italia è di 1 caso su 2710 nati vivi. L'introduzione dei programmi di *screening* ha reso possibile il trattamento precoce dei nuovi casi di IC diagnosticati in Italia e di conseguenza la prevenzione di *deficit* mentali e neuromotori.

Uno studio caso-controllo coordinato dall'ISS e recentemente conclusosi ha messo in evidenza una elevata frequenza di gemelli tra gli ipotiroidici congeniti e conseguentemente un rischio molto elevato e statisticamente significativo di IC per le gravidanze gemellari rispetto a quelle singole..

Il Registro Nazionale degli ipotiroidi congeniti (RNIC), che raccoglie le informazioni su tutti i nuovi casi di IC diagnosticati, ha consentito di intraprendere uno studio di carattere esplorativo su questo argomento.

Utilizzando i dati del Registro, sarà possibile separare gli IC nati da parto gemellare da quelli nati da parto singolo e quindi descrivere e studiare i due gruppi.

Nell'ambito dello stesso progetto ci si propone di raccogliere informazioni (zigosità, numero di gemelli nati, sesso, concordanza per IC) sui nuovi casi di IC nati da parto gemellare e di seguire nel tempo gli stessi gemelli per valutare la transitorietà della condizione e identificare, successivamente alla nascita, forme di ipotiroidismo nel cogemello.

Risultati attesi nel triennio

Nel periodo preso in esame (1989-2002) ci aspettiamo di aver arruolato nel registro circa 2400 bambini. In collaborazione con il Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze dell'ISS, si stimerà la frequenza di gravidanze multiple tra gli IC e queste stime verranno confrontate con la frequenza osservata a livello nazionale.

Da un'analisi preliminare, condotta su un numero inferiore di anni e dai dati derivanti dallo studio caso-controllo ci si aspetta di trovare una frequenza di gravidanze multiple più elevata tra gli IC rispetto alla popolazione generale. Il confronto delle caratteristiche neonatali dei gemelli IC, ricavate dalla scheda di arruolamento, e dei gemelli della popolazione generale, ricavate dai dati ISTAT, consentirà di evidenziare possibili differenze tra i due gruppi. Verrà valutato il peso alla nascita, la settimana gestazionale, l'età della madre, il giorno del prelievo.

Per la descrizione delle diverse forme di IC (ghiandola in sede, agenesia, ipoplasia e iperplasia della ghiandola) nei bambini nati da parto gemellare o da parto singolo si confronteranno gli esiti degli esami strumentali (ecografia e/o scintigrafia).

I valori di TSH rilevati allo *screening* e alla conferma verranno utilizzati per il confronto dei due gruppi (gemelli-singoli) e un modello di analisi multivariata consentirà di confrontare i livelli medi indipendentemente dalle altre variabili.

Trasferibilità dei risultati

I risultati preliminari hanno mostrato differenze tra gli IC nati da parto gemellare e singolo; se questi risultati verranno confermati particolare attenzione dovrà essere posta nel caso di gravidanze multiple. Inoltre, se dovessero emergere differenze tra i due gruppi in termini di valori ormonali (tsh, FT4 alla prima e alla seconda determinazione) si può ipotizzare la necessità di procedure di *screening* particolare per gemelli.

A dedicated surveillance network for vaccine preventable infectious diseases: EUVAC-NET

EUVAC.NET è un *network* europeo istituito nel dicembre 1999, dedicato alla sorveglianza delle malattie prevenibili da vaccino e ai relativi programmi di vaccinazione. Durante la prima fase di attività, è stato creato un *network* di epidemiologi delle nazioni partecipanti. Le principali attività sono state la sorveglianza del morbillo, coordinata dallo *Statens Serum Institut* (SSI) danese in collaborazione con l'Ufficio europeo dell'OMS, e della pertosse, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità. Per il prossimo triennio, il progetto verrà condotto in stretta collaborazione con il Centro Europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), e verranno svolte attività aggiuntive quali la sorveglianza della rosolia, della rosolia congenita, della parotite e della varicella. Il Reparto di epidemiologia delle malattie infettive del CNESPS coordinerà una unità operativa mirata alla valutazione dei sistemi di sorveglianza sentinella presenti in Europa. Reti di medici sentinella per la sorveglianza delle malattie prevenibili da vaccino sono infatti già operanti in vari Stati europei, tra cui Francia, Italia, Belgio e Svizzera. Verranno quindi raccolte da tutti gli stati membri informazioni circa l'esistenza di tali sistemi, le

loro caratteristiche in termini di popolazione osservata e metodi di raccolta, trasmissione e analisi dei dati. Per iniziare un percorso di armonizzazione tra nazioni, verrà inoltre definito un data set minimo di variabili da raccogliere, in base ai dati già raccolti dai sistemi in vigore.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi generali di EUVAC-NET sono:

- Creare e mantenere un *network* della Comunità europea dedicato alle malattie infettive prevenibili da vaccino, basato su metodi di sorveglianza epidemiologica e di laboratorio
- Includere nel *network* il monitoraggio delle politiche vaccinali
- Diffondere e scambiare informazioni sulla frequenza delle malattie infettive prevenibili con le vaccinazioni e sulle strategie vaccinali.

Per quanto riguarda l'unità operativa coordinata dal reparto di malattie infettive, i risultati attesi includono:

- Realizzare un inventario delle reti di sorveglianza sentinella basate su medici e pediatri attualmente presenti degli Stati membri dell'UE per le malattie prevenibili con le vaccinazioni
- Identificare i punti di forza e debolezza di tali sistemi di sorveglianza
- Stimare i denominatori dei sistemi di sorveglianza sentinella
- Raccogliere e confrontare gli strumenti utilizzati e i dati raccolti dalle reti sentinella
- Incoraggiare l'introduzione di sistemi di sorveglianza esaustivi laddove questi non siano presenti
- Facilitare lo scambio di informazioni ed esperienze tra le varie reti sentinella
- Migliorare l'efficienza dei sistemi scambiando informazioni sui metodi di raccolta dei dati
- Definire un *data set* minimo delle variabili da raccogliere

Trasferibilità dei risultati

EUVAC.NET contribuirà a sostenere e facilitare i programmi di vaccinazione nazionali mirati all'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita, prevista in Europa entro il 2010. Verranno infatti raccolti dati sulle strategie di vaccinazione e sulla incidenza delle malattie prevenibili. Questi dati saranno oggetto di una *newsletter* trimestrale e di *report* annuali, pubblicati sul sito *web* di EUVAC NET (www.euvac.net). I risultati del progetto saranno inoltre pubblicati su riviste scientifiche e in congressi internazionali, con l'obiettivo di facilitare le strategie relative alla sorveglianza e prevenzione delle malattie prevenibili da vaccino, e l'armonizzazione delle politiche seguite nei vari Stati membri.

Per quanto riguarda i sistemi di sorveglianza sentinella, verrà messo a punto un *database* in cui raccogliere attraverso i *gate keepers* nazionali i dati raccolti dalle diverse reti. Verrà quindi pubblicato un inventario delle reti di sorveglianza sentinella esistenti in Europa. Sul sito *web* del progetto saranno inoltre pubblicati i protocolli e gli strumenti utilizzati dalle reti sentinella, e l'incidenza stimata delle malattie in sorveglianza.

Aggregazione familiare di epatopatia cronica, alterazioni del metabolismo glico-lipidico e autoimmunità: studio di popolazione in due Centri del Nord e Sud d'Italia

Lo studio è finalizzato a definire nella popolazione generale di due diverse aree geografiche italiane:

la prevalenza, i determinanti, le associazioni reciproche e le aggregazioni familiari di epatopatia cronica, alterazioni del metabolismo glico-lipidico e autoimmunità (I fase trasversale)

follow-up per causa di morte (fase longitudinale)

l'incidenza delle alterazioni di funzionalità epatica, del metabolismo glico-lipidico e dell'autoimmunità nella II fase trasversale effettuata a distanza di 10 anni.

Sarà reclutato un campione casuale di 1:5 residenti tra 18 e 75 anni di due cittadine del Nord e Sud Italia (provv. di MI e RC), per un totale di 3800 e 1200 soggetti arruolati. Inoltre saranno reclutati i fratelli dei soggetti positivi alla diagnosi di Sindrome Metabolica (ATP III) e dei soggetti con presenza di steatosi epatica non alcolica con negatività per anti-HCV o HBsAg.

Obiettivi specifici del nostro reparto sono:

costituire una banca di materiale biologico e di DNA nucleare e mitocondriale di fenotipi ben caratterizzati;

stimare il rischio di ricorrenza familiare di ciascuno dei caratteri sopracitati e le loro associazioni familiari;

valutare l'ereditabilità dei singoli endofenotipi

pianificare studi di *linkage* e di associazione dei geni candidati per i fenotipi altamente ereditabili.

Risultati attesi nel triennio

Stima della prevalenza dell'epatopatia cronica, delle alterazioni del metabolismo glico-lipidico e dell'autoimmunità e delle associazioni intraindividuali non casuali fra le stesse.

Identificare i *loci*, i genotipi e gli *alleli linked* e associati con l'epatopatia di origine infettiva e metabolica, con i parametri del metabolismo glico-lipidico.

Valutazione della frazione dei casi attribuibile a specifici genotipi/alleli.

Trasferibilità dei risultati

La sindrome metabolica è un fattore di rischio per patologia cardiovascolare e diabetica.

Si stima una prevalenza tra il 20 e il 40% nella popolazione, a seconda del gruppo rappresentato e della definizione adottata.

Lo studio in oggetto potrebbe chiarire il modello più adatto da applicare alla S.M., così da poter intervenire sulla gravidanza, sulle abitudini di vita, farmacologicamente nel modo più appropriato.

Inoltre, essendo questo studio indirizzato ad una popolazione generale, i risultati dell'analisi avranno caratteristiche di generabilità, così come ci si attende da un modello.

La possibilità di caratterizzare fenotipicamente i soggetti e seguirli in *follow-up* permetterà di valutare il rischio di morte per patologia.

L'eventuale identificazione di nuovi geni potrà permettere lo sviluppo di nuovi farmaci.

Alcol. Attività di elaborazione e realizzazione di attività di ricerca, prevenzione e di promozione della salute collegate alle programmazioni e alle politiche socio-sanitarie a livello nazionale, regionale, europeo e internazionale

Gli obiettivi e le attività sull'alcol sono principalmente dedicati alla attuazione delle progettualità e delle specifiche linee di ricerca già attive in Istituto e relative ai progetti internazionali, europei e nazionali:

1) Progetto P.R.I.S.M.A. (*Italian Project P.R.I.S.M.A. Italian project on Prevention, Identification and Strategies Management for Alcol-related problems*). Progetto per la promozione di strategie di prevenzione precoci dell'alcoldipendenza per la riduzione del danno alcol-correlato nei *setting* e nei servizi socio-sanitari di base

2) Collaborative Study on Implementing Country-wide early identification and brief intervention strategies in Primary Health Care – Phase IV. World Health Organization

3) Progetto Europeo 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.

4) Progetto Alcohol Policy Network in the context of a larger Europe: Bridging the Gap EU Public Health Programme. European Commission

5) Progetto ELSA. Enforcement Of National Laws And Self-Regulation On Advertising And Marketing Of Alcohol

6) Osservatorio Nazionale Alcol - OssFAD

Le attività sono orientate alla produzione di dati epidemiologici, evidenze scientifiche e di strumenti utili alla 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* dedicato 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) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (*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.

L'Osservatorio Nazionale Alcol – OssFAD è l'articolazione nazionale del Centro Collaboratore del WHO per la Ricerca e la Promozione della Salute sull'Alcol. Contribuisce alle Relazioni annuali al Parlamento relative alla legge 125/2001, elabora e pubblica sul sito *web* (www.iss.it/ofad) aggiornamenti periodici originali sui dati epidemiologici e sui risultati dei progetti attuati nell'Istituto Superiore di Sanità e sulle Indagini Multiscopo ISTAT attraverso una attiva e costante collaborazione. Il Ministero della Salute finanzia il Telefono Verde Alcol (800 63 2000) con funzioni di servizio al cittadino. Organizza annualmente l'*Alcohol Prevention Day* e fornisce consulenza tecnico-scientifica al Ministero della Salute, alle Regioni, alle Aziende Sanitarie Locali con cui collabora alla realizzazione di campagne e di iniziative di promozione della salute attraverso i finanziamenti previsti dalla Legge 125/2001.

Tra le attività salienti, che includono quelle del piano di lavoro concordato e approvato a livello governativo per il Centro Collaborativo del WHO per la Ricerca sull'Alcol, sono quelle di partecipazione alla produzione delle evidenze scientifiche correlate alla identificazione precoce dell'abuso alcolico e all'intervento breve, a ricerche sulla identificazione e disseminazione delle linee guida cliniche per l'integrazione delle attività preventive specifiche nei *setting* di medicina generale, alla produzione di strategie condivise europee per la riduzione del rischio alcol-correlato (dettagli alle pagine *web*: <http://www.phepa.net/units/phepa/html/en/dir360/doc8870.html>, <http://www.who-alcohol-phaseiv.net/italy.htm>, http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/italy.pdf).

Risultati attesi nel triennio

Pubblicazioni scientifiche

Ridefinizione delle conoscenze riguardo i problemi alcol correlati tra gli operatori socio-sanitari, popolazione generale, amministratori locali, organizzazioni

Qualificazione degli operatori coinvolti sulla metodologia e sui materiali utilizzati per diffondere l'approccio sperimentale

Aumento della quota di bevitori a rischio a cui viene indicato il *counselling* da parte dei MMG e degli operatori socio-sanitari

Riduzione, nella comunità, dei problemi alcol correlati

Dimostrazione della riduzione dei costi sociali e sanitari alcol-correlati

Creazione strumenti di rilevazione epidemiologica di valenza europea (*Health Monitoring Programme*)

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*

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

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 il Ministero della Salute. 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.

Analisi dei CEAP e delle SDO relativi all'evento parto/nascita

Verrà condotta una analisi epidemiologica dei dati routinari (CEAP/SDO) relativi alla nascita, allo scopo di valutare quanto le modalità del parto siano in linea con le raccomandazioni internazionali e con il Progetto Obiettivo Materno Infantile.

Risultati attesi nel triennio

Stima della prevalenza delle procedure appropriate e inappropriate e dei fattori ad esse associati, stima della prevalenza degli esiti al parto.

Trasferibilità dei risultati

Verrà proposto un modello di analisi epidemiologica dei dati routinari relativamente alla nascita, applicabile a livello nazionale e a livello locale. L'analisi dei dati permetterà di valutare l'appropriatezza delle procedure adottate, i fattori associati e le prevalenze degli esiti al parto, al fine di verificare il livello di corrispondenza delle procedure routinarie rispetto alle raccomandazioni nazionali (progetto obiettivo materno infantile) e internazionali (OMS) relativamente alla nascita.

Analisi delle correlazioni genotipo-fenotipo per le malattie autoimmuni

Il progetto ha l'obiettivo di analizzare le correlazioni genotipo-fenotipo per alcune malattie autoimmuni di cui si occupa il reparto di Epidemiologia Genetica del CNESPS (malattie infiammatorie croniche dell'intestino, *lupus* sistemico eritematoso, diabete di tipo 1, celiachia, ecc.). Con gli studi di correlazione genotipo-fenotipo si intende indagare l'esistenza di sottotipi di malattia che risultano essere più associati di altri al *locus* sotto esame che è già stato dimostrato essere associato alla malattia nel suo complesso. Quindi si vuole rispondere alla seguente domanda: dato che il *locus* sotto studio è risultato, in altri studi, essere associato alla malattia, esistono sottotipi di questa malattia che sono più associati di altri al genotipo di rischio? Nel corso del 2004-2005 queste tecniche sono state applicate a due studi, entrambi sulla malattia

di Crohn. Nel corso del triennio 2006-2008 l'obiettivo è l'applicazione di queste tecniche ad altre malattie autoimmuni (es. *Lupus* Sistemico Eritematoso e Colite Ulcerosa) e ad altri *loci*, diversi dai due precedentemente studiati, associati alla malattia di Crohn.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi di questo progetto sono l'identificazione di sottotipi di malattia particolarmente associati ai *loci* che già si conoscono come fattori di rischio genetico per tali malattie. Per esempio, i due studi effettuati sulla malattia di Crohn hanno evidenziato come essere portatori di almeno un allele di rischio per l'IBD5 aumenti significativamente la probabilità che l'infiammazione sia localizzata nell'ileo e in almeno in un altro punto dell'intestino (una sorta di infiammazione "estesa") e come il DLG5 sia un fattore di rischio genetico per la malattia di Crohn solo negli uomini e non nelle donne.

Trasferibilità dei risultati

I risultati attesi da questi studi possono aiutare i clinici nella diagnosi di questo tipo di malattie definite complesse e in particolare sono di grande utilità nella prescrizione di terapie specifiche, sulla base dei genotipi, di cura o prevenzione di complicazioni.

Analisi delle ricadute sulle comunità scientifiche dell'attività del Comitato Nazionale per la Bioetica

La ricerca si propone di analizzare l'influenza che i pareri e le mozioni elaborati dal Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB) hanno esercitato sulle comunità scientifiche italiane. In ambito internazionale analisi simili sono state proposte, per esempio, con riferimento ai documenti del Comitato Internazionale di Bioetica dell'UNESCO.

La ricerca sarà condotta in collaborazione con il Dott. Giovanni Incorvati, che è stato per nove anni membro della Segreteria Scientifica del CNB.

L'attività si svilupperà a partire dal reperimento della bibliografia relativa all'attività del CNB, dalla sua catalogazione e organizzazione in un *database*, dal suo esame critico. L'analisi che successivamente ne scaturirà sarà esposta in pubblicazioni destinate sia agli esperti e agli operatori professionalmente coinvolti, sia al pubblico. Saranno pubblicati articoli su riviste specializzate e un libro, per il quale sono già stati presi contatti con alcuni editori.

Risultati attesi nel triennio

Finora in Italia non è stato analizzato in modo approfondito e sistematico l'impatto che i documenti elaborati dal CNB hanno esercitato sulle comunità scientifiche italiane. L'analisi potrà offrire spunti utili per lo stesso CNB e per i destinatari dei documenti.

Dal progetto potranno inoltre scaturire strumenti utili ai fini formativi e didattici. In particolare il *database* bibliografico, suddiviso per aree tematiche, potrà essere uno strumento utile sia per il lavoro di operatori e studiosi, sia per finalità didattiche. Esso potrà eventualmente integrarsi con altri sistemi informativi già esistenti nel settore della bioetica, tra cui il Sistema Informativo per la Bioetica in Linea (SIBIL) operativo presso il Settore Documentazione dell'ISS.

I risultati del lavoro svolto in stretta collaborazione saranno divulgati mediante articoli su riviste specializzate e tramite la pubblicazione di un libro destinato a un più ampio pubblico.

Trasferibilità dei risultati

L'analisi potrà avere ricadute utili a livello sia nazionale, sia internazionale.

A livello nazionale, infatti, finora non sono stati eseguiti studi analoghi: pertanto, i risultati potranno essere utili a diverse istituzioni, tra cui, ovviamente, il CNB.

A livello internazionale i risultati dell'analisi potranno essere utili per il confronto con esperienze analoghe realizzate in altre Nazioni e per favorire il coordinamento tra i Comitati

Nazionali istituiti negli altri Paesi europei, secondo gli auspici più volte espressi in sedi internazionali e sovranazionali (Consiglio d'Europa, Commissione Europea, e altre).

Appropriatezza d'uso dei farmaci - Progetto Mattoni

Una prescrizione è appropriata se effettuata all'interno delle indicazioni cliniche e, in generale, all'interno delle indicazioni d'uso (dose, durata, via di somministrazione, interazioni ecc.), per le quali è stata dimostrata l'efficacia.

La valutazione dell'appropriatezza della prescrizione può avvenire seguendo due modalità principali. La prima è quella di confrontare le modalità di prescrizione con *standard* predefiniti, costruiti sulla base della migliore evidenza scientifica disponibile. La seconda deriva dall'analisi della variabilità prescrittiva. Mentre nel primo caso lo scostamento da un comportamento considerato atteso consente di evidenziare un intervento potenzialmente inappropriato, nel caso della variabilità l'intento è di mettere in evidenza aree sulle quali concentrare l'attenzione e che richiedono approfondimenti successivi.

I sistemi informativi correnti possono evidenziare sia potenziali scostamenti da comportamenti considerati attesi, che la variabilità della prescrizione. Scopo della ricerca è quello di un inquadramento complessivo del tema dell'appropriatezza d'uso dei farmaci, con particolare riferimento alle valutazioni che utilizzano le informazioni raccolte attraverso i sistemi di monitoraggio delle prescrizioni effettuate a livello territoriale del SSN.

Risultati attesi nel triennio

L'identificazione del modello o dei modelli di riferimento per la descrizione e la valutazione dei percorsi clinici, la specificazione dei fabbisogni informativi e classificativi, la proposizione delle corrette modalità di utilizzo dei modelli al fine di migliorare la qualità e l'appropriatezza dell'assistenza, l'eventuale sperimentazione operativa del modello o dei modelli di riferimento, al fine di verificarne le eventuali criticità d'uso costituiscono i principali risultati attesi dal Progetto.

Trasferibilità dei risultati

La linea descritta si riconduce all'area "Misura dell'appropriatezza" della progettualità denominata "Mattoni del SSN". La spiegazione di tale denominazione risiede negli obiettivi principali del progetto, che si propone di giungere alla realizzazione di un linguaggio comune per il SSN rispetto agli elementi costitutivi della sanità in un contesto di crescente autonomia regionale.

La corretta progettazione e sviluppo del Nuovo Sistema Informativo Sanitario richiedono infatti la disponibilità di un linguaggio comune per consentire l'interscambio informativo con i sistemi sanitari regionali.

ARISS (Antibiotico Resistenza – Istituto Superiore di Sanità)

Il progetto AR-ISS è un progetto il cui obiettivo primario è il consolidamento di una rete di laboratori di microbiologia clinica per la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza.

Nell'ambito di AR-ISS viene effettuato uno studio prospettico multicentrico per la rilevazione e l'analisi dei dati di antibiotico-resistenza di alcuni microrganismi di particolare rilevanza clinica, responsabili di infezioni invasive (sangue e *liquor*).

Lo studio si avvale di una rete di laboratori partecipanti al progetto su base volontaria, rappresentativi della realtà nazionale per distribuzione sul territorio e afferenza a strutture ospedaliere, che effettuano la selezione, l'identificazione e la caratterizzazione del fenotipo di resistenza dei ceppi oggetto di studio. Il coordinamento centrale epidemiologico e microbiologico, è situato presso l'Istituto Superiore di Sanità, responsabile della raccolta,

integrazione, analisi e divulgazione dei dati, del controllo di qualità dei dati pervenuti, nonché della raccolta centralizzata di ceppi selezionati, inviati dai centri sul territorio.

La raccolta delle informazioni avviene a cadenza trimestrale e riguarda *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto permette di integrare i dati del sistema routinario con informazioni che non sono in esso disponibili fornendo anche informazioni dettagliate sulla frequenza delle patologie in oggetto.

Il principale risultato atteso è un database con i risultati dei test di antibiotico-resistenza relativi a isolati di *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* responsabili di infezioni invasive (batteriemie e meningiti).

I dati della base di dati permetteranno, relativamente ai patogeni sotto sorveglianza, di monitorare l'andamento dell'antibiotico resistenza in Italia, la comparsa di nuovi *pattern* di resistenza e la loro diffusione.

I dati raccolti saranno anche inviati alla sorveglianza Europea EARSS della UE sulla antibiotico resistenza, di cui ARISS è il progetto *partner* italiano.

Ariss inoltre permette di disporre di una rete sentinella di laboratori ospedalieri di microbiologia per l'antibiotico-resistenza e i fenomeni ad essa correlata.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle analisi saranno disseminati a intervalli regolari tra i partecipanti al progetto e gli operatori sanitari che necessitano di questi dati nazionali. Trattandosi di una sorveglianza di eventi sanitari all'interno del SSN la trasferibilità dei risultati è totale. I risultati potranno essere utilizzati per proporre nuovi studi *ad hoc* su problematiche emergenti della antibioticoresistenza.

Attivazione di un sistema di rilevazione rapida della mortalità e messa a punto di un modello di studio dei fattori di rischio della mortalità associata alle ondate di calore (Parte 2)

Nel 2003 una grave ondata di calore si è verificata in molti Paesi europei con un drammatico incremento della mortalità osservata rispetto all'atteso. In Italia ad esempio sono stati stimati circa 8000 decessi in eccesso rispetto all'analogo periodo dell'anno precedente. Il progetto di durata biennale si prefigge di identificare i metodi e le procedure per stimare i fattori di rischio associati alla mortalità per:

- cause direttamente correlate al calore;

- cause nelle quali il calore può aver agito da fattore scatenante

allo scopo di orientare gli interventi di prevenzione verso i gruppi di popolazione a maggior rischio. Il progetto produrrà quindi un protocollo operativo per lo svolgimento di uno studio caso-controllo da realizzarsi in caso di ondate di calore e delle stime di rischio di decesso associato a ondate di calore ottenute tramite uno studio caso-controllo, da effettuarsi nell'eventualità di un'ondata di calore nel biennio 2006-2007

Risultati attesi nel triennio

Il progetto di studio servirà a identificare i fattori di rischio personali legati alle abitudini di vita (uso di condizionatori di aria, ventilatori, abitudine a tenere le finestre aperte la notte, ecc.) livello di autonomia funzionale (capacità di provvedere alle comuni attività della vita quotidiana) e al livello di integrazione sociale (frequentazione di amici, circoli per anziani, attività ricreative) al fine di diffondere una serie di consigli pratici su comportamenti individuali

da evitare o da attuare durante l'ondata di calore e supportare l'utilità di interventi mirati alla creazione di luoghi di socializzazione.

Inoltre permetterà di identificare i fattori di rischio legati alle caratteristiche ambientali delle abitazioni (tipo di abitazione, presenza di balconi, residenza all'ultimo piano ecc.) al fine di diffondere una serie di consigli pratici su comportamenti da attuare in casa durante l'ondata di calore.

Infine si identificheranno i fattori di rischio clinici associati alla mortalità da ondata di calore per definire le patologie maggiormente associate a rischio di morte durante un'ondata di calore e identificare dei gruppi a rischio ai cui indirizzare gli interventi.

Dal punto di vista degli interventi in salute pubblica lo studio permetterà di valutare l'effetto delle iniziative di prevenzione condotte nelle varie città al fine di supportarne l'implementazione in altre città.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto si prefigge di testare e validare un metodo e delle procedure di studio per permetterne la riproduzione in diverse realtà, urbane e rurali per esempio, del nostro Paese. La trasferibilità costituisce un criterio chiave nella sperimentazione di metodi e procedure del progetto.

Comunicazione in oncologia

Il progetto, realizzato in collaborazione con l'Ufficio Relazioni Esterne dell'Istituto Superiore di Sanità, si propone di mettere a punto una griglia per l'autovalutazione e la valutazione esterna della capacità di comunicazione degli operatori del settore oncologico nei rapporti con i malati e con i familiari. Sono stati finora elaborati 19 riquadri, ciascuno contenente una decina di criteri espressi in termini operativi, per i quali si chiede di dare una valutazione su una scala da 0 a 5. Tra i riquadri più importanti vi sono quelli relativi alla comunicazione della diagnosi e della prognosi, alla comunicazione del piano terapeutico e al coinvolgimento attivo dei malati nel piano terapeutico.

Ci si propone di completare i riquadri, di ottenere l'approvazione allargata da parte dei servizi oncologici italiani sia ospedalieri sia domiciliari e di procedere poi alla sperimentazione mediante l'autovalutazione seguita da una valutazione esterna.

Si valuterà anche l'effetto formativo che può avere già la semplice lettura dei criteri contenuti nei riquadri.

Risultati attesi nel triennio

Ci si aspetta che la diffusione di questi criteri di buona comunicazione migliori la comunicazione tra operatori, malati e familiari e rappresenti una fonte di sollievo delle sofferenze psicologiche dei malati. Dovrebbe anche promuovere un maggiore coinvolgimento dei malati nella scelta dei trattamenti e alleviare l'ansia e la depressione conseguenti alla mancata espressione della propria preoccupazione nei confronti delle esperienze collegate a una malattia grave, specie nella fase a prognosi infausta.

Trasferibilità dei risultati

Per la grande chiarezza e concretezza dei criteri già sviluppati e che ci si propone di sviluppare, il manuale risultante dovrebbe costituire uno strumento di formazione, di autovalutazione e di valutazione esterna facilmente diffondibile a tutti i livelli dell'assistenza, dall'ospedale, all'*hospice*, all'assistenza domiciliare. Inoltre il manuale potrebbe costituire un modello per interventi analoghi nel campo di altre malattie gravi.

Determinanti genetiche e ambientali delle nascite pretermine

Obiettivo dello studio è l'analisi dei fattori di rischio genetici e ambientali delle nascite pretermine.

Vengono arruolati, retrospettivamente, tutti i neonati pretermine afferiti al Nido, alla Patologia Neonatale, e alla Sala Parto dell'Ospedale S.Eugenio di Roma negli anni 1998-2002 incluso. Le fonti di informazione sono rappresentate dalla cartella clinica neonatale e materna (anamnesi, diario clinico, esame obiettivo, esami effettuati, lettera di dimissione con allegata relazione clinica) e dalla scheda ostetrica. Il dato relativo alla nati-mortalità viene recuperato dalla documentazione rilasciata dalla Sala Parto. In caso di decesso, trattandosi di una importante variabile di esito, vengono raccolte informazioni relative alla causa che lo ha determinato.

I bambini verranno richiamati dai clinici che partecipano allo studio al fine di ottenere un *follow-up* sull'esito neurologico e per il prelievo di materiale biologico.

La fase di raccolta dati al *baseline* è terminata e tali dati verranno analizzati nel 2006. Sempre nel 2006 inizierà l'organizzazione del *follow-up* clinico.

Risultati attesi nel triennio

I primi risultati attesi sono di tipo epidemiologico: incidenza nati-pretermine, tasso di mortalità perinatale e neonatale nei pretermine, tasso di nati mortalità, incidenza delle patologie neonatali nel pretermine, incidenza dei fattori di rischio ambientali del parto pretermine, rischio relativo di parto pretermine fra esposti e non esposti ai fattori di rischio individuati.

Per quanto riguarda le determinanti genetiche, poco è stato studiato ma vari studi riportano la familiarità del fenomeno. Studi su geni candidati hanno messo in evidenza un polimorfismo alla posizione 3953 nel gene interleuchina 1 beta associato al parto pretermine per i neri americani mentre un allele del gene dell'antagonista del recettore dell'interleuchina 1 è risultato associato al parto pretermine negli ispanici. Allo stesso modo polimorfismi del TNF-alfa sono risultati associati al parto pretermine solo con rottura prematura delle membrane (pPROM). Tutti questi risultati suggeriscono, ma non confermano in modo definitivo, una base genetica del parto pretermine. Quindi uno degli obiettivi dello studio sarà di cercare di chiarire la familiarità e le basi genetiche del parto pretermine e vedere se queste interagiscono con le determinanti ambientali.

Trasferibilità dei risultati

L'impatto sulla sanità pubblica, in termine di mortalità perinatale, neonatale e morbilità, nella determinazione dei fattori genetici e ambientali del parto pretermine e delle loro eventuali interazioni ha un grande potenziale nel chiarificare la patogenesi del fenomeno e quindi nell'indirizzare le politiche di intervento in questo settore.

Educazione alla salute nella scuola

Il Progetto vede la collaborazione dell'ASP Lazio, le ASL del Lazio, la Facoltà di Psicologia dell'Università "la Sapienza", diverse scuole di Roma e Provincia.

Obiettivo è quello di introdurre nella scuola l'Educazione alla Salute come materia curricolare formativa della personalità, consapevolezza di sé e delle proprie azioni, del benessere psichico e fisico, di criticità di pensiero, di capacità e strumenti per affrontare i cambiamenti della vita.

È stato costituito un gruppo di lavoro per lo sviluppo dell'idea dell'educazione alla salute per condividere impostazione e metodi di lavoro, valorizzando l'esperienza esistente.

Abbiamo censito le attività di educazione sanitaria nelle scuole a Roma e Provincia da cui si rileva che l'attività di informazione è spesso integrativa rispetto al piano formativo, occasionale, e priva di progetto e valutazione.

In diverse riunioni del gruppo si è arrivati a condividere l'approccio metodologico coinvolgente gli studenti (*peer education, counselling*) e mirato ad aumentare le capacità di affrontare le difficoltà (*life skills*).

Prevediamo di effettuare la formazione di formatori all'uso del materiale didattico predisposto e di cominciare la sperimentazione in alcune scuole medie superiori di Roma e Provincia nel prossimo anno accademico 2006-07.

Questa attività si configura come un modello di intervento che, se corroborato da un adeguato successo della sperimentazione, potrà successivamente essere riprodotto in altre regioni.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono:

materiale didattico per l'educazione alla salute per tutti gli ordini di scuola pubblicati e disponibili.

diversi formatori tra giovani laureati o laureandi in psicologia, sociologia, pedagogia e/o discipline similari, preparati per l'insegnamento nelle scuole.

risultati della sperimentazione in alcune scuole utili a ridefinire l'intervento didattico.

un modello di azione da replicare in altre aree e regioni

Trasferibilità dei risultati

Il beneficio per i ragazzi e per la scuola, a seconda dell'efficacia dell'intervento, saranno evidenti in termini di benessere e di profitto, di riduzioni dei problemi di disagio e dispersione scolastica.

Una volta messo a punto il modello può essere applicato ad altre regioni ad altre realtà.

Effective and Acceptable Strategies for the Control of SARS and new emerging infections in China and Europe - SARS control

L'epidemia di SARS ha mostrato che nuove infezioni trasmesse per contatto stretto tra persone possono diffondersi rapidamente tra nazioni, con una rilevante morbosità. Tali malattie possono inoltre causare un'importante allarme nell'opinione pubblica, e costituire un considerevole danno economico per le nazioni interessate. È quindi fondamentale valutare la possibilità che si verifichino eventi di questo tipo, il loro impatto di salute, economico e sull'opinione pubblica. Il progetto SARSControl mira a migliorare la risposta di salute pubblica a infezioni emergenti come la SARS, attraverso una migliore conoscenza delle modalità di diffusione degli agenti causali, unita alla valutazione e comunicazione del rischio, e all'analisi economica. Tutte queste attività saranno condotte insieme ai decisori politici e agli stakeholders delle nazioni europee, in modo da migliorare i processi decisionali. I dati sui casi di SARS verificatisi in Cina e i dati forniti dall'OMS verranno utilizzati per sviluppare modelli di diffusione geografica della SARS. Verrà quindi sviluppata una serie di modelli riferiti a diversi approcci, con diversi parametri epidemiologici e di interventi di controllo. I risultati dei modelli epidemiologici saranno a loro volta combinati con le analisi delle conseguenze economiche delle infezioni da SARS, in modo da valutare l'impatto economico di diverse strategie di controllo. Dall'insieme di queste attività deriveranno delle raccomandazioni condivise sulle politiche da attuare per la prevenzione e il controllo.

Risultati attesi nel triennio

SARSControl è un progetto integrato multidisciplinare che ha l'obiettivo di fornire supporto alle politiche europee verso le malattie infettive emergenti.

In particolare, il progetto si svilupperà lungo le linee seguenti

conoscenza della diffusione della SARS in varie nazioni affette, con attenzione particolare alla Cina (nazione epicentro dell'epidemia), e valutazione dei fattori determinanti la sua diffusione;

controllo di possibili future epidemie di SARS e di altre malattie emergenti, mettendo a punto strategie di intervento basate su modelli epidemiologici ed economici;

strategie di sorveglianza e comunicazione del rischio per il controllo efficace della SARS.

Questi obiettivi saranno raggiunti dalle diverse unità operative, cui il CNESPS parteciperà come *partner*.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di modelli sulla diffusione delle malattie infettive insieme ai diversi stati membri dell'UE consentirà di stimare l'eventuale impatto di future malattie emergenti, e di valutare i diversi interventi di sanità pubblica (ad esempio, *screening* dei viaggiatori in entrata e uscita dalle diverse nazioni, quarantena dei casi e dei loro contatti stretti, vaccinazione). La simultanea raccolta delle informazioni sull'impatto economico permetterà di valutare il rapporto costo-efficacia di tali interventi, e di identificare le migliori azioni da attuare in diversi paesi e in diversi contesti. Lo studio delle strategie di comunicazione sulla SARS delle varie nazioni permetterà di identificare le modalità di comunicazioni più efficaci. In conclusione, le informazioni sui modelli di trasmissione, sul costo-beneficio e sulla comunicazione del rischio forniranno un modello per lo sviluppo in Europa di una politica di sanità pubblica comune in risposta alle malattie infettive emergenti.

Efficacy of cancer control and cancer care: a public health perspective

Il progetto coinvolge diverse attività oggetto di collaborazione con il NCI-NIH in termini modellistica e applicativi:

1) Sviluppo del *database* centrale con i dati dei Registri Tumori Europei, Canadesi, USA, Australiani, Giapponesi e di alcuni altri registri in Asia, America Latina e in Africa Settentrionale, allo scopo di :

produrre stime dei principali indicatori di *cancer burden*

identificare problematiche di efficacia dallo studio comparativo internazionale.

costituire una base per gli sviluppi statistici e modellistica per la stima e la proiezione di incidenza sopravvivenza, prevalenza e mortalità per tumore.

2) Sviluppo di metodi statistici e modelli quantitativi per la produzione di applicazioni sistematiche di indicatori:

stima di indicatori di esito

metodi statistici per estrapolare indicatori derivati da dati dei Registri Tumori a livello locale a livello regionale o nazionale.

stima dell'impatto futuro dei tumori in Europa e in USA

predire l'impatto di misure preventive a livello di popolazione

scomporre la prevalenza dei tumori in categorie associate con la domanda sanitaria (curati, in trattamento, a rischio di recidive, ecc.)

3) Campi applicativi speciali si riferiscono a particolari classi della popolazione con caratteristiche particolari, quali:

I tumori negli anziani.

I tumori nei bambini e i giovani adulti..

I tumori rari.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità di un *database* con dati dei registri tumori europei aggiornati al 2002 nel corso del 2005

importazione del *database* nel *software* SEER*Stat per l'analisi basilare di incidenza, sopravvivenza, prevalenza e mortalità

Stima e proiezione dell'incidenza, prevalenza e mortalità per tumori della mammella per stato in US

Stima e proiezione dell'incidenza, prevalenza e mortalità per tutti i tumori maligni per stato in US

Stima e proiezione dell'incidenza, prevalenza e mortalità per i principali tumori per regione in Italia.

Aggiornamento delle stime e proiezioni i tumori principali nei Paesi europei

Trasferibilità dei risultati

Pianificazione delle risorse sanitarie a livello locale, regionale, nazionale.

Definizione di malattie rare e di *orphan drugs*.

Metodi statistici e *software* statistico resi disponibili per altre applicazioni

Epidemiologia clinica e outcome dei pazienti con sindromi coronariche acute ospedalizzati in Italia. Italian Network on Acute Coronary Syndromes (IN-ACS) Outcome

Numerosi studi hanno evidenziato che i pazienti ricoverati in ospedali a diverso livello tecnologico presentano *pattern* di trattamento differente che dipendono più dal tipo di ospedale in cui vengono ricoverati che dalle diverse caratteristiche cliniche di base. La indicazione ad eseguire le procedure di rivascolarizzazione dipende quindi più dalle caratteristiche dell'ospedale che dalle caratteristiche cliniche dei pazienti. Tuttavia, dati preliminari dello studio Blitz-2 mostrano che la prognosi dei pazienti a breve termine non differisce grandemente nelle strutture cardiologiche con o senza emodinamica una volta che vengano analizzati i risultati tenendo conto delle caratteristiche di base dei pazienti stessi. Ai fini di una corretta gestione della sanità regionale e nazionale è fondamentale quindi conoscere l'epidemiologia clinica e l'*outcome* delle SCA.

Risulta quindi estremamente interessante raccogliere oggi i dati relativi alla realtà italiana in uno specifico registro, utilizzabile estensivamente in ogni tipo di struttura ospedaliera che ricoveri i pazienti con SCA.

Lo studio, denominato IN-ACS *Outcome*, ha come presupposto generale quello di misurare l'*outcome* clinico dei pazienti con SCA a breve e medio termine. Nello studio, i centri partecipanti, selezionati in modo da essere rappresentativi della realtà nazionale per quanto riguarda distribuzione geografica e livello tecnologico della struttura, raccoglieranno informazioni sistematiche nei pazienti con sindrome coronarica acuta nel corso del ricovero ospedaliero e nel *follow-up* a 1, 3, 6, 12 mesi dall'arruolamento.

Un *linkage* con i dati amministrativi (principalmente SDO) verrà implementato al fine di assicurare la consecutività dell'arruolamento, la completezza delle informazioni nella fase di *follow-up*, una maggiore conoscenza delle eventuali comorbidità della popolazione oggetto di studio.

Risultati attesi nel triennio

Outcome primario

Morte per ogni causa a 30 giorni e a 12 mesi.

Outcome secondari

Morte/Reinfarto a 30 giorni, a 6 mesi e a 12 mesi

Reospedalizzazioni per infarto miocardico con sopraslivellamento di ST a 12 mesi

Reospedalizzazioni per NSTEMI-SCA a 12 mesi

Reospedalizzazioni per scompenso a 12 mesi

Reospedalizzazioni per eseguire procedure di rivascolarizzazione a 12 mesi

Outcome “organizzativi”

Saranno identificati anche degli *end-point* “organizzativi” che valuteranno i determinanti indipendenti di utilizzo di risorse.

Per i pazienti dimessi con diagnosi di STEMI: percentuale di pazienti sottoposti a rivascolarizzazione farmacologica o percutanea e determinanti clinico organizzativi di non esecuzione di terapia ripercussiva.

Per i pazienti dimessi con diagnosi di NSTEMI-SCA: percentuale di pazienti che vengono sottoposti a strategia invasiva entro 48 ore dall'ingresso e determinanti clinico-organizzativi di esecuzione della terapia invasiva.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto oltre ad essere utili alla società scientifica e ai singoli professionisti per le loro valutazioni interne relativamente alla qualità delle prestazioni fornite ai cittadini, saranno di fondamentale importanza sia per le Regioni sia per il Ministero della Salute nella stesura dei propri piani di attività.

Anche il cittadino potrà usufruire delle informazioni derivanti da questo progetto per arrivare a compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dal Sistema Sanitario Nazionale.

Epidemiologia descrittiva dei tumori rari

Lo sviluppo delle tecniche diagnostiche molecolari porterà inevitabilmente al riconoscimento di nuove entità nosologiche a bassa frequenza (malattie rare).

Lo scopo di questo progetto è di sviluppare una epidemiologia dei tumori rari (incidenza, sopravvivenza, prevalenza) finalizzata alla promozione e al supporto delle reti italiana ed europea dei tumori rari, alla pianificazione della ricerca eziologica e clinica a livello internazionale, e alla organizzazione dell'assistenza

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 (EUROCORE e SEER).

Studio della sopravvivenza di popolazione delle neoplasie rare. Dopo la pubblicazione di un articolo su *Lancet Oncology* (Gatta G et al. *Survival from rare cancer in adults: a population – based study*. *Lancet Oncology*, Published online December 13, 2005), altri articoli sono in preparazione.

Nel corso del 2006 si prevede di promuovere una *consensus conference* per consolidare la definizione di tumore raro. Inoltre si prenderanno in esame alcuni tumori rari per affrontare i problemi sopra citati. Un tumore raro che in Italia pone diversi quesiti è il mesotelioma. È aperta la questione della sorveglianza degli ex esposti e del trattamento. Diverse iniziative sono in

studio: un *trial* sulla valutazione dell'efficacia della terapia chirurgica e la valutazione di *marker* per la diagnosi precoce della neoplasia. Un gruppo di lavoro si è costituito a questo proposito che include oltre a clinici e ricercatori anche rappresentanti delle associazioni e dell'ambito politico

Trasferibilità dei risultati

Definizione di farmaci orfani, programmazione degli studi clinici

Epidemiologia di agenti selezionati di Malattie Infettive in Uganda

L'attività è costituita da un insieme di linee di ricerca che, sebbene diversificate rispetto al *background*, obiettivi e risultati attesi, hanno in comune alcune particolarità che le caratterizzano.

Innanzitutto le attività sono basate sulla ricerca epidemiologica, intesa come strumento scientifico e operativo utile per migliorare le conoscenze, sviluppare strategie per la prevenzione e la cura delle malattie infettive, identificare i bisogni e le priorità, pianificare interventi di qualità, gestire e monitorare le azioni, e valutare i risultati raggiunti.

In secondo luogo, le attività riguardano lo studio di malattie infettive a carattere epidemico che hanno un forte impatto sulla salute pubblica dei paesi dell'Africa sub-sahariana, ma anche una potenziale ricaduta sulla salute pubblica dei paesi sviluppati.

Il terzo elemento comune è costituito dalla localizzazione geografica delle attività, la quale è giustificata dalla difficoltà di realizzare ricerche epidemiologiche su malattie infettive quali HIV/AIDS, Malaria ed Ebola in contesti diversi da quello africano. Questo contesto operativo, seppure distante geograficamente da quello italiano, permette di contribuire allo sforzo della comunità scientifica internazionale volto a migliorare le conoscenze e il controllo di infezioni che, vista la crescente mobilità della popolazione mondiale, hanno una rilevanza sanitaria anche per i paesi sviluppati.

Risultati attesi nel triennio

Stima dell'andamento temporale dell'epidemia da HIV/AIDS in Nord Uganda e identificazione dei fattori socio-demografici associati con l'infezione tramite un sistema di sorveglianza sentinella tra le donne gravide afferenti alle cliniche pre-natali.

Valutazione della validità di alcuni metodi per stimare la prevalenza di HIV/AIDS nella popolazione generale adulta correggendo i dati di prevalenza osservati tra le donne gravide in funzione della fertilità differenziale tra donne HIV-positivo e donne HIV-negativo

Descrizione del profilo epidemiologico della popolazione del Nord Uganda attraverso l'analisi dei dati derivati dai sistemi informativi sanitari.

Valutazione dell'effetto della malaria e altre infezioni tropicali altamente diffuse nell'Africa sub-sahariana sull'incidenza e la progressione dell'infezione da HIV/AIDS.

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 e programmi curativi per pazienti sieropositivi)

Valutazione della risposta clinica, immunologica e virologica e dell'eventuale resistenza ai farmaci antiretrovirali tra i pazienti HIV-positivi che hanno avuto accesso a tale tipo di terapia.

Stima della siero-prevalenza di anticorpi verso l'Ebola in gruppi di popolazione del distretto di Gulu in Nord Uganda nel periodo precedente lo scoppio dell'epidemia di Ebola nel 2000/2001.

Trasferibilità dei risultati

Il contesto in cui è pianificata questa attività di ricerca, seppure lontano geograficamente da quello italiano, consentirà di contribuire allo sforzo internazionale finalizzato a una migliore conoscenza di malattie infettive che hanno una rilevanza sanitaria anche per il nostro paese e gli altri paesi sviluppati, oltre che alla lotta, ormai riconosciuta come prioritaria dalle principali

organizzazioni internazionali e dalle autorità locali ugandesi, contro infezioni quali HIV/AIDS e malaria.

I risultati dell'attività contribuiranno inoltre 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'Istituto Superiore di Sanità, rappresenta una base operativa altamente strategica per la conduzione di studi sulle malattie infettive.

Etica della ricerca e della pratica in sanità pubblica

L'attività ha origine in una serie di collaborazioni con progetti di ricerca attivi sia presso l'Istituto Superiore di Sanità (Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute; Centro Nazionale Trapianti; Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze; Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, e altri), sia presso altre istituzioni (CNR; Centro per la Scienza, la Società e la Cittadinanza, e altre). I progetti di ricerca spaziano in vari ambiti della ricerca e della pratica nel settore sanitario (genetica, oncologia, ecc.) e al loro interno includono sotto-progetti finalizzati all'analisi delle problematiche etiche peculiari per ciascuno degli argomenti specifici.

L'insieme di tali collaborazioni consente una valutazione diretta delle problematiche etiche poste dai diversi settori di ricerca e di intervento della sanità pubblica.

Il quadro complessivo, tratto dalla partecipazione ai singoli progetti, sarà oggetto di pubblicazioni destinate agli operatori, con le quali si offriranno sintesi delle problematiche etiche comuni e proprie per ciascun settore, nonché proposte operative.

Risultati attesi nel triennio

L'insieme delle esperienze acquisite mediante la collaborazione, per le parti di rilevanza etica, con diversi progetti, permetterà di acquisire un patrimonio di conoscenze nel settore dell'etica utili per l'esecuzione di progetti e di attività future. I risultati conseguiti con i singoli progetti saranno infatti riassunti in pubblicazioni che nel loro insieme potranno costituire, in analogia con iniziative simili già realizzate presso altre istituzioni scientifiche, un compendio delle principali problematiche etiche che il personale che opera presso l'ISS o in analoghe istituzioni può incontrare.

L'esigenza di approfondimenti in questo senso e di disporre di strumenti di consultazione è frequentemente espressa dai ricercatori dell'ISS, spesso in occasione della presentazione di protocolli di ricerca al Comitato Etico per la valutazione.

Trasferibilità dei risultati

L'esperienza maturata nell'ambito delle diverse collaborazioni potrà essere utilmente trasferita ai Dipartimenti e ai Centri dell'ISS, ed eventualmente ad altre istituzioni.

EU Public Health Outcome Research and Indicators Collection - EUPHORIC

Questo progetto multidisciplinare è diretto alle autorità e ai decisori politici e ha quale obiettivo la costruzione di un consorzio di paesi europei partecipanti che vogliano cooperare alla identificazione di *benchmarking* per gli esiti di preselezionate patologie e procedure, allo scambio di informazione sugli *standard* di qualità, sulle migliori pratiche e sull'efficacia nell'ambito della salute pubblica, e alla identificazione di elementi comuni e idonei alla costruzione di una piattaforma politica orientata alla garanzia delle "migliori pratiche" per i cittadini europei.

Il progetto avrà la durata di 3 anni e si svolgerà in 3 diverse fasi: *survey*, studio pilota e diffusione dei risultati. Al momento, oltre all'Italia (ISS, Policlinico IRCSS di Milano e ASL

RME) hanno aderito allo studio la Spagna, la Svezia, la Finlandia, la Grecia, l'Austria e la Bulgaria.

Risultati attesi nel triennio

Il *Survey* servirà a identificare gli studi di valutazione degli esiti tra i paesi europei partecipanti. Verrà stilata una lista degli indicatori di esito possibili da calcolare e scelte alcune applicazioni per le quali avviare uno studio pilota. Lo studio pilota prevede l'arruolamento, in ciascun paese partecipante, di strutture sanitarie su cui avviare uno studio specifico per la valutazione d'esito selezionata. Verranno confrontate le possibili fonti di informazione (attiva e passiva) e verranno sviluppati criteri comuni per l'armonizzazione della raccolta dati. Tutti i risultati prodotti verranno pubblicati in varie lingue e periodicamente aggiornati su un sito *web* linkabile dal sito della Unione Europea.

Trasferibilità dei risultati

I Risultati pubblicati sul sito *web* saranno disponibili per le autorità politiche europee, per le istituzioni e per i cittadini. Il sito ospiterà anche un *forum* dedicato alla discussione e scambio di opinioni.

EuroClot (Genetic Regulation of the End-Stage Clotting Process That Leads to Thrombotic Stroke)

EuroClot è un progetto finanziato dalla Commissione Europea nell'ambito del VI Programma Quadro sullo studio della componente genetica della malattia vascolare cerebrale (Ictus), coordinato dal St.Thomas Hospital di Londra. L'Ictus, causa di numerose morti e disabilità nei Paesi industrializzati, mostra una significativa aggregazione familiare.

È stato osservato come che il ruolo dell'ambiente nel causare malattie ischemiche possa essere modulato da una componente ereditaria. È lecito pensare che il patrimonio genetico di alcuni soggetti possa determinare differenze nella struttura delle molecole coinvolte nella coagulazione e nella fibrinolisi aumentando così il rischio della patologia. Obiettivo di questo progetto è quello di individuare i fattori genetici implicati nella fase finale della formazione del *clot* causa dell'ictus. È previsto il coinvolgimento di diversi gruppi di epidemiologia genetica europei, tra cui il reparto di Epidemiologia Genetica del CNESPS che contribuirà con lo studio di 150 coppie di gemelli dizigoti. Su tutti i soggetti verranno rilevati alcuni parametri ematochimici della coagulazione e fibrinolisi, così come alcune caratteristiche che influenzano il rischio di Ictus. Le analisi verranno effettuate in laboratori inglesi (Lees, Londra) e olandesi (Leiden). Sarà inoltre estratto il DNA dal sangue prelevato per eseguire le analisi di scansione del genoma che avverranno a Helsinki.

Risultati attesi nel triennio

Stima della ereditabilità nelle caratteristiche dei fattori di attivazione della coagulazione e in quelle della fibrina.

Individuazione di polimorfismi di suscettibilità all'*ictus*.

Trasferibilità dei risultati

Attuazione di prevenzione "personalizzata" con farmaci, la modifica mirata di alcune abitudini di vita, nonché una maggiore e più appropriata sorveglianza medica.

Inoltre, studiando il rapporto tra un determinato genotipo e l'evento ischemico si potrà arricchire la comprensione del processo patologico, fondando così le basi per terapie nuove e più efficaci.

European Coordination Action for Policy Research of Mental Disorders (EPREME)

Il progetto si propone di condurre un'analisi approfondita, e coordinata tra i vari Paesi, dei dati raccolti con il progetto ESEMED-MHEDEA su un campione di oltre 21.000 cittadini europei, dei quali 4.712 italiani, per valutare: prevalenza e comorbidità dei disturbi mentali; impatto dei disturbi mentali; uso dei servizi e dei farmaci psicotropi per il trattamento dei disturbi mentali; fattori di rischio sociodemografico e di altro tipo per i disturbi mentali.

Si intende anche elaborare una lista di “buone pratiche per la ricerca sulla frequenza e monitoraggio dei disturbi mentali”.

Risultati attesi nel triennio

Dati sulla prevalenza 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.

European Public Health Ethics Network 1 (EuroPHEN 1)

L'obiettivo finale del progetto, che sarà sintetizzato in un rapporto destinato prima alla Commissione Europea e poi al pubblico, è l'individuazione di valori comuni per facilitare l'adozione in Europa di politiche comuni nel settore della sanità pubblica. L'obiettivo sarà raggiunto mediante un'analisi comparativa, sotto il profilo dell'etica, delle politiche nazionali già attuate nel settore della sanità pubblica nei vari Paesi partecipanti. L'analisi comparativa riguarda sia aspetti generali (come, ad esempio, l'organizzazione delle strutture con competenze in sanità pubblica nelle varie azioni e le relative responsabilità), sia aspetti specifici (malattie infettive e vaccinazioni, rapporti tra ambiente e salute, protezione dei soggetti partecipanti a sperimentazioni, salute e sicurezza sui luoghi di lavoro, e altri). Gli aspetti specifici sono stati approfonditi nella prima fase del progetto anche mediante sondaggi di opinione tra la popolazione, la cui analisi proseguirà nel terzo anno di operatività del progetto. I sondaggi sono stati condotti sotto forma di *focus group*, con modalità identiche nei vari Paesi per permettere la comparazione. I sondaggi di opinione hanno affrontato aspetti connessi alle legislazioni “paternalistiche”, al rapporto tra libertà personali e regole sociali, al bilanciamento tra diritti e responsabilità, e altri. L'analisi finale dei *focus groups* sarà oggetto di un rapporto destinato alla Commissione Europea.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto offrirà un confronto, sotto il profilo dell'etica, di: organizzazione delle istituzioni di sanità pubblica nei Paesi membri dell'Unione Europea, priorità identificate dalle politiche di

sanità pubblica in ciascuno degli Stati, politiche adottate a fronte di problemi specifici di sanità pubblica.

L'analisi etica mette in luce come teorie, tradizioni, principi proposti per l'etica applicata allo specifico settore in esame siano interpretati e adottati nelle diverse nazioni.

Un aspetto cui il progetto dedica particolare attenzione riguarda le implicazioni di etica degli eventuali conflitti tra interessi privati e pubblici. La valutazione di come tale problematica sia percepita nelle diverse nazioni è effettuata anche mediante la realizzazione di *focus groups* organizzati, con criteri uniformi, nei diversi Paesi.

L'analisi etica, effettuata con un criterio comparativo, valuta se un approccio comune all'etica della sanità pubblica nei diversi Paesi membri dell'Unione sia fattibile e auspicabile.

Trasferibilità dei risultati

Uno degli aspetti che più qualificano l'*European Public Health Ethics Network* è il coinvolgimento di istituzioni operanti nei vari Paesi membri dell'Unione. Pertanto, l'analisi elaborata nell'ambito del progetto offre spunti utili sia all'interno dei singoli Paesi, sia per il trasferimento di informazioni e il loro confronto tra Paesi diversi.

European Public Health Ethics Network 2 (EuroPHEN2)

Alla fine dell'anno 2006, al termine del progetto EuroPHEN, si prevede di avviare il progetto EuroPHEN2.

Il lavoro condotto nell'ambito di EuroPHEN2 si svilupperà sulla base dei risultati ottenuti con il precedente progetto EuroPHEN. Si continuerà l'analisi, sotto il profilo dell'etica, delle politiche di sanità pubblica adottate nei vari Paesi membri dell'Unione. I nuovi obiettivi rispetto al primo progetto sono costituite principalmente da quattro ordini di motivi.

Il primo riguarda la scelta degli argomenti di etica della sanità pubblica affrontati: nel precedente progetto erano state scelte otto problematiche esemplificative. La scelta di un numero limitato di temi specifici era motivata dai limiti imposti dalle risorse umane, dai fondi disponibili, dalla durata temporale del progetto. EuroPHEN2 prenderà in considerazione argomenti diversi, non affrontati nel precedente progetto, ma non meno importanti per la completezza dell'analisi.

Il secondo riguarda il livello di approfondimento. I temi affrontati nel precedente progetto non saranno abbandonati: durante lo svolgimento del lavoro, infatti, si è constatato come molti spunti meritino ulteriori analisi, che non è stato possibile condurre nel corso del primo progetto a causa dei limiti sopra citati.

Il terzo motivo riguarda il nuovo assetto determinatosi con l'allargamento dell'Unione realizzato nel maggio 2004. Sono già stati fruttuosamente attivati contatti con i Paesi di nuovo ingresso. La partecipazione di tali Paesi consentirà di avere un quadro ampio, completo e aggiornato dell'etica della sanità pubblica nell'Europa attuale.

Il quarto motivo riguarda nuovi eventi molto significativi verificatisi dopo l'inizio del precedente progetto. Tra questi vi sono l'adozione di nuovi documenti di riferimento per la bioetica da parte di varie istituzioni internazionali (UNESCO, Consiglio d'Europa, e altre) e l'emergere di malattie infettive con un forte impatto sulla sanità pubblica (sindrome respiratoria severa acuta, influenza aviaria).

Risultati attesi nel triennio

I risultati più significativi rispetto al precedente progetto riguardano l'estensione dell'analisi all'Europa orientale, grazie alla partecipazione di Paesi entrati nell'Unione nel 2004.

Saranno inoltre esaminati, dal punto di vista dell'etica, problemi sollevati da argomenti di sanità pubblica la cui rilevanza è fortemente cresciuta rispetto al momento dell'avvio del

precedente progetto. Tra questi vi sono nuove epidemie (Sindrome Respiratoria Severa Acuta, Influenza aviaria, e altre).

Si prevede inoltre l'intensificazione della collaborazione con Stati Uniti d'America e Canada, che formalmente non saranno *partner* del progetto, ma con i quali sono già operativi proficui scambi. Ciò consentirà di ampliare il confronto e di proporre anche fuori dall'Europa i risultati ottenuti.

Al termine del progetto saranno redatti documenti di analisi e sintesi da proporre alla Commissione Europea. I temi trattati in tali documenti saranno ripresi, in modo divulgativo, in pubblicazioni e libri destinati al pubblico.

Trasferibilità dei risultati

Il lavoro svolto nell'ambito del progetto EuroPHEN2, come già avvenuto con il precedente progetto, sarà caratterizzato dall'uniformità dei criteri per l'analisi svolta in ciascuno degli stati membri. Ciò consentirà un'efficace comparazione a livello internazionale dei risultati ottenuti nelle singole nazioni, nonché lo scambio di informazioni, proposte e analisi tra i vari Paesi.

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 6° 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 2800 coppie di fratelli ultranovantenni in 17 diverse aree geografiche e 2800 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'Istituto Superiore di Sanità 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 2 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 3 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.

Genome-wide analyses of European twin and population cohorts to identify genes predisposing to common diseases. GENOMEUTWIN

Nel 2002 è stato costituito un consorzio tra i registri di gemelli di Danimarca, Finlandia, Italia, Norvegia, Paesi Bassi, Regno Unito, Svezia e Australia. Il progetto è stato finanziato dalla Commissione Europea e il Consorzio è stato nominato Centro di Eccellenza per la Genomica in Europa.

Per quanto riguarda la parte italiana dello studio, la prima fase è consistita nell'arruolamento. Ad agosto 2005 si erano iscritti al Registro Nazionale (RNG) circa 8 mila gemelli volontari. Sui gemelli arruolati si rileveranno dati sensibili attraverso un questionario sullo stato generale di salute. Inoltre, in questa fase dello studio, sarà chiesta (a un sotto-campione della popolazione arruolata) la donazione del DNA da sangue o da mucosa buccale per eseguire le analisi di scansione del genoma relative agli obiettivi del progetto stesso.

Parallelamente, per studiare i fenotipi emicrania e *ictus* (patologie oggetto dello studio genetico), è stata avviata una collaborazione con le società scientifiche di neurologi affinché vengano individuati tra i pazienti coloro che sono gemelli (studio clinico). Verrà chiesta l'adesione allo studio sia al gemello con la patologia che al co-gemello ed entrambi verranno invitati presso il centro clinico di provenienza per essere sottoposti a un esame neurologico e a un prelievo di sangue per la donazione di DNA.

Risultati attesi nel triennio

sviluppo di nuove strategie che sfruttino le caratteristiche uniche delle coorti di gemelli europee, inclusa la disponibilità di dati longitudinali sugli stili di vita e sui fattori di rischio ambientali;

sviluppo di nuovi metodi molecolari per la tipizzazione, in sotto campioni di coorti di gemelli selezionate per specifici tratti, di centinaia di *marker* multiallelici e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*);

sviluppo di nuove strategie matematiche adeguate a combinare l'informazione sui profili genetici che sottendono a tratti comuni;

sviluppo di metodi statistici per l'analisi di dati longitudinali, e relativi a specifici periodi di età, per identificare geni che vengono espressi solo a certe età della vita;

identificazione dei fattori genetici più rilevanti che sono associati all'altezza, al peso, all'emisferia, alla patologia cerebro e cardiovascolare nella popolazione europea.

Trasferibilità dei risultati

Creazione di una solida infrastruttura nell'ambito della ricerca europea che utilizzi i registri di popolazione;

armonizzazione e standardizzazione dei *database* epidemiologici, fenotipici e genotipici allo scopo di facilitare analisi aggregate;

messa a punto di sistemi di controllo di qualità e sicurezza dei dati allo scopo di fornire il più alto livello di confidenzialità dei dati;

realizzazione di un servizio centralizzato di estrazione e tipizzazione del DNA raccolto e sviluppo di una politica comune per il consenso informato e tutte quelle problematiche etiche e legali relative a questa area tematica.

II Progetto CUORE - Epidemiologia e prevenzione delle malattie cardiovascolari

Il progetto si articola in differenti linee di ricerca:

1.sorveglianza: ha l'obiettivo di stimare incidenza, prevalenza, letalità, sopravvivenza, utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche per le malattie cardiovascolari; di descrivere la distribuzione dei fattori di rischio e le condizioni a rischio cardiovascolare (ipertensione arteriosa, diabete, dislipidemia, obesità, sindrome metabolica); di spiegare attraverso incidenza degli eventi, consumo di farmaci, numero di ricoveri ospedalieri e fattori di rischio l'andamento in discesa della mortalità coronarica dal 1980 al 2000. A livello europeo ha l'obiettivo di stilare raccomandazioni e metodologie per implementare i sistemi di sorveglianza cardiovascolare. Si esplica attraverso:

registro nazionale degli eventi coronarici, cerebrovascolari

registro della sindrome coronarica acuta

registro dell'obesità

EUROCISS – cardiovascular indicators surveillance set

2.rischio cardiovascolare: ha l'obiettivo di aggiornare il rischio cardiovascolare della popolazione italiana attraverso l'integrazione degli studi longitudinali e il *follow-up* per gli eventi cardiovascolari fatali e non fatali; di valutare il ruolo dei classici e dei nuovi fattori di rischio nella predizione delle malattie cardiovascolari (attività fisica, fattori socioeconomici, proteina C reattiva fattori infiammatori). Si realizza attraverso il *follow-up* 18 coorti, che hanno arruolato circa 50.000 persone di età compresa fra 20 e 84 anni alla linea base.

3.Banca di campioni biologici: mantenimento della banca (siero, plasma *buffy coat* ed emazie impacchettate), estrazione del DNA dai campioni di *buffy coat* delle coorti longitudinali e realizzazione di studi caso controllo innestati nella coorte relativi a nuovi fattori di rischio.

4.Applicazione della carta del rischio e del punteggio individuale nella pratica clinica da parte dei MMG, dei centri di medicina preventiva, dei centri trasfusionali e valutazione del loro utilizzo e applicazione.

Risultati attesi nel triennio

1.sorveglianza: tassi di incidenza, prevalenza, letalità, sopravvivenza, e utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche per le malattie cardiovascolari per fasce di età e sesso; distribuzione dei fattori di rischio e delle condizioni a rischio cardiovascolare; applicazione del modello IMPACT per spiegare l'andamento in discesa della mortalità coronarica dal 1980 al 2000. Raccomandazioni e metodologie per implementare i sistemi di sorveglianza cardiovascolare a livello europeo.

2.rischio cardiovascolare: aggiornamento del rischio cardiovascolare della popolazione italiana attraverso l'integrazione degli studi longitudinali e il *follow-up* per gli eventi cardiovascolari fatali e non fatali e inclusione di nuovi fattori di rischio nella predizione delle

malattie cardiovascolari (attività fisica, fattori socioeconomici, proteina C reattiva fattori infiammatori); allargamento della predizione alla fascia di età 69-75 anni.

3. Banca di campioni biologici: mantenimento della banca (siero, plasma *buffy coat* ed emazie impacchettate), estrazione del DNA dai campioni di *buffy coat* delle coorti longitudinali e realizzazione di studi caso controllo innestati nella coorte relativi a nuovi fattori di rischio.

4. Applicazione della carta del rischio e del punteggio individuale nella pratica clinica da parte dei MMG, dei centri di medicina preventiva, dei centri trasfusionali e valutazione del loro utilizzo e applicabilità nella pratica clinica.

Trasferibilità dei risultati

1. Manuale delle operazioni per l'impianto di registri di popolazione per le malattie cardiovascolari basato sull'appaiamento dei dati correnti di mortalità e di dimissione ospedaliera e sulla validazione di un campione di eventi per stimare i valori predittivi positivi dei singoli codici ICD-9 relativi a eventi fatali e non fatali. Questo permetterà di produrre mappature territoriali standardizzate e confrontabili in tempi diversi.

2. Aggiornamento degli strumenti di valutazione del rischio cardiovascolare da distribuire ai medici di medicina generale, ai cardiologi e agli altri specialisti da utilizzare nella pratica clinica: l'esistenza di punteggi individuali e di carte del rischio ha una ricaduta favorevole sull'efficacia e l'efficienza della prevenzione cardiovascolare, perché è in grado di ottimizzare l'informazione scientifica disponibile sulla popolazione italiana e di correggere problemi di sopravvalutazione e sottovalutazione nell'identificazione degli individui a rischio cardiovascolare elevato, evitando sprechi di risorse e operazioni sanitarie non eque, cioè non dirette a tutti i cittadini che si trovino nelle condizioni di ottenerle. La valutazione dei nuovi fattori di rischio permette inoltre di inserire nel punteggio individuale nuove variabili per migliorare la predizione delle malattie cardiovascolari e ottenere strumenti predittivi sempre più agili e che si adattino bene alla realtà italiana.

3. Corsi di formazione per formatori e per medici di medicina generale e altri operatori sanitari per l'uso e l'applicazione della carta del rischio cardiovascolare e per il punteggio individuale.

4. Banca di campioni biologici.

Inappropriatezza dell'uso dei farmaci nell'anziano: rilevanza in clinica e farmacoeconomia

Stimare la prevalenza dell'uso dei farmaci potenzialmente inappropriati in un gruppo di anziani ricoverati in ospedale e nel *post* acuzie e nell'ambulatorio dei medici di medicina generale.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione dei predittori, correlati clinici e socio-ambientali associati all'uso di farmaci inappropriati nell'anziano.

Trasferibilità dei risultati

Modifica della pratica clinica corrente nel trattamento farmacologico nei pazienti con età avanzata e stima dei benefici attesi nel Sistema Sanitario Nazionale.

Indagine campionaria su conoscenze, attitudini e comportamenti degli/le adolescenti riguardo la salute riproduttiva

Verrà condotta una indagine campionaria con selezione probabilistica di campioni di adolescenti secolarizzati con somministrazione di questionari codificati da parte di personale

addestrato nelle ASL che aderiranno all'indagine e in particolare nelle ASL che hanno chiesto la consulenza per l'implementazione del Progetto Obiettivo Materno Infantile.

Risultati attesi nel triennio

Stima delle conoscenze, delle abitudini e dei comportamenti degli/le adolescenti riguardo la salute riproduttiva e dei fattori associati.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite potranno favorire l'aggiornamento delle politiche di promozione della salute riproduttiva fra gli adolescenti.

Indagine campionaria sugli esiti della gravidanza e parto riguardo la salute delle donne e del/la bambino/a

Verrà condotta un'indagine campionaria con interviste domiciliari a campioni di donne che hanno partorito 6, 9 e 12 mesi prima. Le interviste con questionario codificato verranno effettuate da personale addestrato nelle ASL che aderiranno all'indagine e in particolare nelle ASL che hanno chiesto la consulenza per l'implementazione del Progetto Obiettivo Materno Infantile.

Risultati attesi nel triennio

Stima della prevalenza dell'allattamento al seno a tempi stabiliti e di condizioni di disagio psicologico e dei fattori associati.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dell'indagine permetteranno di aggiornare i protocolli operativi dell'applicazione del progetto obiettivo materno infantile.

Indagine campionaria sulla percezione del dolore in travaglio e parto

Verrà condotta un'indagine campionaria con selezione probabilistica delle donne che hanno partorito nei centri nascita che aderiranno alla ricerca e in particolare in quelli delle ASL che hanno chiesto la consulenza per l'implementazione del Progetto Obiettivo Materno Infantile. Le donne saranno intervistate da personale addestrato con questionario codificato entro 48 ore dal parto.

Risultati attesi nel triennio

Stima della prevalenza di livelli di percezione del dolore in funzione delle specifiche modalità di conduzione del travaglio-parto e in relazione alla qualità dell'assistenza alla gravidanza.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite mediante l'indagine permetteranno di aggiornare le strategie per il contenimento del dolore al travaglio parto.

Indagine campionaria sulle procedure di rilascio della certificazione IVG nell'attività consultoriale

Verrà condotta un'indagine campionaria sulle procedure seguite nei consultori familiari pubblici in relazione al percorso di richiesta di certificazione di IVG. L'indagine, con questionario codificato, verrà svolta nelle ASL che aderiranno all'indagine e in particolare nelle ASL che hanno chiesto la consulenza per l'implementazione del Progetto Obiettivo Materno Infantile.

Risultati attesi nel triennio

Stima della prevalenza della continuità della presa in carico, della percentuale delle rinunce al proseguimento della richiesta in seguito al colloquio e delle percentuali di ritorni al consultorio dopo l'effettuazione dell'IVG.

Trasferibilità dei risultati

I risultati permetteranno di aggiornare le linee guida per il potenziamento del ruolo dei consultori familiare in applicazione della legge 194.

Indicatori di salute e alle modalità di individuazione di obiettivi e azione e di 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 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 che termina il 30/04/2008

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 sperimentato nel Progetto SINDIS e l'attivo coinvolgimento di ISTAT, Ministero della Salute, CCM, Università, Agenzia per i Servizi Sanitari Regionali si procederà alla rilevazione dei parametri funzionali alla definizione dello *standard* europeo di monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei a partire dagli indicatori ECHI (www.healthindicators.org). Attraverso la progettualità e le competenze nazionali coordinate dall'Istituto Superiore di Sanità ci si propone di verificare e fornire una valutazione esaustiva delle fonti disponibili, delle basi di dati esistenti, dei *gap* esistenti rispetto al formato e alle definizioni di indicatori stabiliti dalla *short list* dell'ECHI2 e alla produzione successiva dei dati nazionali da far confluire sul Portale Europeo *Knowledge and Information System* secondo modalità condivise di *reporting* periodico dello stato di salute della popolazione. Il gruppo di ricerca svolgerà anche il ruolo di Segretariato del *Working Party* del *Public Health Programme* dedicato agli *Health Indicators* e nell'ambito di un *Network* Europeo di 5 *Public Health Institutes* attuerà la valutazione di implementabilità nei 25 stati della Unione Europea a partire dall'anno 2005 (dettagli sul sito http://europa.eu.int/comm/health/ph_projects/2004/action1/action1_2004_02_en.htm).

Ulteriori specifiche competenze sugli indicatori sono attive in settori specifici quali:

1) Indicatori di Salute delle Popolazioni, *Burden of Disease*, DALYs.

Attività dedicate allo sviluppo di tecniche e misure di salute delle popolazioni che integrino informazioni di mortalità e morbilità con misure di valutazione di impatto più adeguate a descrivere e comparare il rapporto costo-efficacia dei diversi tipi di interventi sanitari (DALY *Disability Adjusted Life Years*). La programmazione delle attività prevee di produrre stime su selezionati fattori di rischio e malattie quali l'alcol, l'*ictus*, il diabete mellito, l'Alzheimer.

2) Indicatori di *Performance* dei Sistemi Sanitari.

Attività dedicate allo sviluppo di tecniche e misure di valutazione della *performance* complessiva del sistema sanitario, intesa come raggiungimento dei suoi obiettivi generali, mediante un *set* di indicatori sintetici, omogeneo, integrato e standardizzato proposto dalla OMS per la produzione del *World Health Report* annuale. È in corso di programmazione la prosecuzione dello studio collaborativo con l'Agenzia Regionale della Sanità del Friuli Venezia Giulia e il CEIS-Sanità, Centro Studi Economici della Università di Tor Vergata.

3) Indicatori degli esiti degli interventi di assistenza sanitaria (*outcome*).

Attività dedicate agli obiettivi della linea di ricerca specifica del Progetto Mattoni del Ministero della Salute avente come finalità la rilevazione e la misura, nella popolazione, degli

esiti degli interventi di assistenza sanitaria (*outcome*), la disponibilità di strumenti conoscitivi che permettano di valutare lo stato di salute, la diffusione delle malattie, la distribuzione dei determinanti di salute, il grado di efficienza, di efficacia e di qualità dei servizi sanitari. Tali attività sono interfacciate e contribuiscono a livello europeo al Progetto EUPHORIC “*EU Public Health Outcome Research and Indicators Collection*” con l’intento di raccogliere e coordinare, in collaborazione con il Reparto Epidemiologia delle Malattie Cerebro e Cardiovascolari del CNESPS, le informazioni sulle metodiche per la valutazione degli esiti degli interventi di assistenza sanitaria in Europa.

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

I risultati sono ampiamente trasferibili ai contesti europei, nazionali e regionali. Le attività, i cui risultati verranno sottoposti all’approvazione del Consiglio dei Ministri della Salute nel 2008, consentiranno di definire 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 dello *European Portal of Knowledge and Information System* disponibile sul sito EU di *Public Health*.

Informatizzazione del sistema routinario delle segnalazioni e notifiche delle malattie infettive

Il sistema di notifica dati routinari per la sorveglianza delle malattie infettive e delle sorveglianze speciali è affidato alle singole regioni che devono far 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 permette oggi di creare nuovi sistemi di raccolta dati basati su un *server web* facilmente accessibili a tutti i livelli di segnalazione inclusi i medici di medicina generale, i pediatri di libera scelta e gli ospedali. Il progetto mira a rendere pienamente operativa una sperimentazione già avvenuta in collaborazione con la Regione Valle d’Aosta per un sistema per raccolta delle segnalazioni e notifiche attraverso un unico *server web* secondo una metodologia comune (Simiweb). Per evitare una centralizzazione totale, il sistema permetterà la connessione in tempo reale con sistemi simili, già esistenti o in divenire, al fine di scambiare fra *server* regionali e nazionali.

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. Essa mira a fare da progetto “ponte” verso il progetto CCM del Ministero della Salute che intende riformare il flusso informativo e informatico delle malattie infettive.

Risultati attesi nel triennio

Dimostrazione della fattibilità di un sistema di segnalazione/notifica basato sull’immissione dati eseguita dai medici segnalatori (flusso informativo).

Dimostrazione della fattibilità di un sistema evoluzione del SIMI 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.

Valutazione dell'utilità, la semplicità, la funzionalità, l'accettabilità, la tempestività, la flessibilità, la completezza e la rappresentatività del sistema informativo basato su *web*.

Un rapporto finale sull'esito della sperimentazione con indicazioni per un modello di sistema informativo che possa essere utilizzato a livello nazionale con l'attuale sistema di sorveglianza e con quello attualmente in studio presso il Ministero della Salute.

Trasferibilità dei risultati

Questa attività si basa su un'attività cardine del sistema di sorveglianza delle malattie infettive in Italia e i suoi obiettivi e risultati sono, per definizione, strettamente correlati al SSN.

Successivamente allo sviluppo, il *software* sarà messo a disposizione delle Regioni che ne vorranno fare uso routinario. Il rapporto finale sugli esiti della esperienza potrà essere utile per lo sviluppo, sempre continuo, di un futuro sistema di sorveglianza informatizzata.

Interphone Study - International case-control studies of cancer in relation to mobile phone use

Il progetto consiste nel contributo italiano allo studio caso-controllo internazionale INTERPHONE, coordinato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) e finalizzato a valutare due ipotesi: i) che all'uso del cellulare si associ un incremento dell'incidenza di tumori maligni e benigni nel distretto cervico-encefalico e ii) che l'esposizione alle radiofrequenze (RF) utilizzate nella telefonia cellulare possa promuovere lo sviluppo di tumori nelle sedi anatomiche più vicine alla sorgente di emissione: nervo acustico, parotide ed encefalo. Al progetto INTERPHONE partecipano 13 paesi (Australia, Nuova Zelanda, Canada, Francia, Germania, Inghilterra, Italia, Svezia, Norvegia, Finlandia, Danimarca, Israele e Giappone). La raccolta dati è terminata nel Giugno 2005. Nel triennio 2006-08, verrà condotta l'analisi e verranno pubblicati i risultati del progetto.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi dei dati sarà incentrata sui seguenti argomenti:

- Validazione dell'intensità d'uso del cellulare riferita dai casi e controlli all'intervista mediante dati di traffico forniti dagli operatori di rete. I risultati di questo studio permetteranno di quantificare l'errore di misura legato all'uso di indicatori di esposizione basati sul ricordo personale, di descriverne la tipologia (errore di tipo differenziale o non differenziale) e di valutarne l'impatto sulle stime di rischio osservate nell'analisi del rischio di tumore cerebrale in relazione all'uso del cellulare.
- Rischio di tumore cerebrale in relazione all'uso del cellulare (stime ottenute combinando i dati raccolti nei 13 paesi partecipanti e stime italiane).
- Rischio di tumore cerebrale in relazione all'esposizione a sorgenti di radiofrequenze utilizzate in ambiente di lavoro.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno sottoposti per la pubblicazione su riviste scientifiche. Gli articoli pubblicati contribuiranno ad ampliare le conoscenze scientifiche nelle seguenti aree di specifico interesse per la sanità pubblica:

- Entità e *pattern* dell'errore di misura nelle stime d'intensità d'uso del cellulare basate su interviste;
- Relazione tra uso del cellulare e incidenza di tumori cerebrali;
- Relazione tra esposizione professionale a radiofrequenze e incidenza di tumori cerebrali.

Interventi cognitivi-comportamentali di gruppo nei reparti psichiatrici, in strutture residenziali e in centri diurni

Con questo progetto si intende diffondere e valutare l'approccio cognitivo-comportamentale di gruppo descritto nel volume a cura di Venditelli et al. "L'intervento cognitivo-comportamentale di gruppo nel Servizio Psichiatrico di Diagnosi e Cura" (Torino, Centro Scientifico Editore, 2003), alla cui redazione ha partecipato il reparto di Salute Mentale dell'Istituto.

È appena iniziato uno studio controllato randomizzato di tipo *cluster* in cui alcuni Servizi Psichiatrici di Diagnosi e Cura (SPDC) hanno introdotto al proprio interno l'approccio, mentre altri sono in lista di attesa. Verrà completato questo studio e in base ai risultati conseguiti che, sulla base dei dati raccolti dovrebbero essere estremamente positivi, ne verrà proposta la diffusione in tutti gli SPDC italiani. Parallelamente si inizierà l'applicazione e la valutazione dello stesso approccio con opportuni aggiornamenti nelle strutture residenziali psichiatriche e nei centri diurni.

Si inizierà con semplici studi naturalistici e di *follow-up* per poi procedere a studi controllati, anche in dipendenza dei finanziamenti che sarà possibile ottenere.

Risultati attesi nel triennio

Tra i risultati che si possono considerare molto probabili sulla base dei dati acquisiti, vi sono:

- il miglioramento dell'"atmosfera" delle strutture per utenti affetti da disturbi psichiatrici;
- il miglioramento della comunicazione tra utenti e tra utenti e operatori;
- la riduzione degli atti aggressivi;
- la riduzione delle recidive e dei rientri, soprattutto di quelli in trattamento sanitario obbligatorio.

Trasferibilità dei risultati

L'approccio qui descritto è di facile apprendimento e secondo la nostra esperienza non richiede più di due o tre giorni di formazione intensa seguita da una supervisione periodica distanziata nel tempo. Richiede un cambiamento dell'organizzazione delle strutture interessate, perché prevede la partecipazione di tutti o di gran parte degli operatori agli interventi di gruppo e, per quanto riguarda gli SPDC, la sostituzione di gran parte delle visite mattutine giornaliere con il lavoro di gruppo. In compenso sicuramente l'applicazione dell'approccio comporta una riduzione del carico di lavoro degli operatori e un maggior coinvolgimento del personale non medico. L'approccio quindi di fatto è facilmente trasferibile laddove i dirigenti delle strutture siano disponibili a promuovere gli opportuni cambiamenti organizzativi.

Intossicazioni acute da farmaci: caratterizzazione del fenomeno, messa a punto e valutazione di strategie per la prevenzione

Il progetto ha l'obiettivo di analizzare i casi di intossicazione acuta da farmaci presi in esame dal Centro Antiveneni di Milano, cui pervengono annualmente dalle diverse Regioni italiane circa 20.000 richieste di consulenza per esposizioni a prodotti farmaceutici. I dati raccolti da questo centro nel corso del 2005-2007 verranno analizzati presso l'ISS e forniranno una prima base conoscitiva del fenomeno a livello nazionale. Nell'ambito di tale progettualità, si prevede di dedicare una particolare attenzione all'analisi delle esposizioni accidentali a farmaci in soggetti in età pediatrica e geriatrica.

Risultati attesi nel triennio

L'attività proposta permetterà di acquisire le seguenti conoscenze:

stima dell'entità del fenomeno delle intossicazioni acute da farmaci in Italia e sua caratterizzazione;

individuazione dei principali fattori di rischio per esposizione accidentali a farmaci o in sovradosaggio, con particolare riferimento agli incidenti che coinvolgono soggetti in età pediatrica, ovvero, altri gruppi di soggetti che risultino particolarmente a rischio di esposizione, quali gli anziani;

valutazione dell'impatto di strategie educative/informative sull'uso e la conservazione di farmaci attualmente in uso;

stima dei costi attualmente sostenuti per l'assistenza ospedaliera a pazienti con sintomi di avvelenamento da esposizione in acuto a farmaci e pianificazione di interventi mirati per la prevenzione del fenomeno.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno essere utilizzati per la definizione di un piano nazionale di intervento per la riduzione delle intossicazioni da farmaci, comprensivo di eventuali proposte in vari ambiti, quali: ambito normativo; formazione del personale sanitario; attività di informazione rivolte alla popolazione generale e a gruppi specifici di interesse prioritario; definizione di procedure di sorveglianza atte a valutare la ricaduta delle iniziative per la prevenzione

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 numerose attività istituzionali europee e nazionali:

- 1) Progetto I.P.R.E.A. (Italian Project for Epidemiology of Alzheimer disease)
- 2) Progetto L'anziano nella rete dei servizi: l'uso dei dati amministrativi per l'integrazione e la continuità dell'assistenza geriatrica
- 3) Progetto Modelli clinici e clinico-assistenziali di realizzazione e ottimizzazione della continuità assistenziale per l'anziano fragile
- 4) Coordinated Project ERA-AGE – *European Research Area in Ageing research*. Unione Europea, Sesto Programma Quadro di Ricerca
- 5) ERA-NET – *European Research Area Network on Ageing research* Unione Europea, Sesto Programma Quadro di Ricerca

Le attività di stretta natura epidemiologica sono dedicate alla elaborazione dei dati utili all'identificazione dei determinanti di salute e dei predittori 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 alla 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 *Specific Supported Action* già inoltrata alla DG Research nell'ambito del VI Programma Quadro di Ricerca *HEALTH-AGE, HEALTHy AGEing in Europe: A multidisciplinary approach to identify common markers* (FP6-037615).

Le attività di valutazione della qualità dei servizi e modelli di continuità assistenziale per l'anziano proseguendo e integrando l'esperienza acquisita attraverso il Progetto ULISSE sono rivolte alla valutazione della gestione assistenziale dell'anziano fragile e alla sperimentazione e realizzazione di modelli di continuità assistenziale che consentano l'identificazione di reti

dedicate che possano consentire la valutazione costante della qualità dell'assistenza e dei servizi erogati e il miglioramento e l'ottimizzazione delle strategie preventive e di programmazione socio-sanitaria.

Le attività europee sono prevalentemente rivolte alla identificazione delle buone pratiche relative alla ricerca e al finanziamento sull'invecchiamento in Europa, alla creazione di un *database* comune delle progettualità specifiche, all'identificazione delle priorità emergenti e oggetto di possibili strategie nell'ambito dell'ERA-NET e del futuro 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 raccolta e sul censimento coordinato 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 la 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 pagina *web* www.iss.it/binary/publ/publi/0404.1106653088.pdf).

Risultati attesi nel triennio

- Pubblicazioni scientifiche
- Creazione *database* nazionali
- Creazione 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 ed ERA-NET sono tra i più avanzati del Programma Quadro di Ricerca, hanno avanzato la proposta per la creazione di un *European Institute on Ageing* attraverso la presentazione di un art. 169 e si propongono di realizzare nel VII Programma Quadro un'Area di Ricerca Europea sull'Invecchiamento garantita dalla rete di eccellenza già creata e che ha consentito la definizione delle linee strategiche comuni da seguire attraverso *joint-calls* europei e un *consortium agreement* che garantisce la trasferibilità costante dei risultati agli utilizzatori finali: *policy makers, health professionals*, utenti.

La comunicazione del rischio

La comunicazione del rischio è un processo di cui è condizione essenziale la collaborazione integrata tra tutti i soggetti sociali coinvolti. Infatti, perché la comunicazione raggiunga il suo obiettivo e il messaggio sia compreso dal *target* al quale è rivolto, è fondamentale che la valutazione e la stima del rischio, ottenuta attraverso l'analisi scientifica ed epidemiologica, si colleghi strettamente con la percezione del rischio individuale e collettiva. È quindi opportuno

che le evidenze scientifiche disponibili siano condivise tra tutte le Istituzioni e i soggetti partecipanti, perché questi siano coinvolti nel processo decisionale.

Risulta pertanto fondamentale per gli operatori impegnati nel campo delle malattie infettive in attività di prevenzione e promozione della salute approfondire le conoscenze sulle strategie di comunicazione del rischio e acquisire e/o perfezionare le competenze comunicativo-relazionali in specifici contesti formativi. Ciò è essenziale per l'attivazione di processi decisionali autonomi e responsabili nei cittadini e per il loro coinvolgimento in scelte a favore della salute individuale e collettiva.

Il presente progetto è perciò mirato a mettere a punto un programma di formazione mirato agli operatori sanitari coinvolti nella prevenzione delle malattie infettive, in modo che analizzino le condizioni e i criteri per poter lavorare in modo collaborativo, integrato e coordinato, in condizioni di emergenza.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si prefigge di pianificare attività di gestione del rischio nell'ambito delle malattie infettive, e progettare il processo di comunicazione sul rischio.

Nel dettaglio, i risultati attesi sono:

- individuare caratteristiche, finalità, attori nel processo di comunicazione del rischio nel campo delle malattie infettive;
- analizzare le fasi evolutive rintracciabili nella storia della comunicazione del rischio;
- individuare i fattori determinanti la percezione del rischio;
- identificare strategie, mezzi e modalità di intervento da utilizzare nel processo di comunicazione del rischio nel campo delle malattie infettive;
- analizzare il rilevante ruolo dei *media* nel processo di comunicazione di un rischio;
- analizzare la rilevanza del processo comunicativo in situazioni di emergenza (*crisis communication*)

Trasferibilità dei risultati

Il presente progetto viene sviluppato attraverso un'attività di formazione degli operatori impegnati nei Dipartimenti di Prevenzione sul territorio nazionale, svolta a livello centrale e/o regionale/locale. L'approfondimento delle competenze comunicative rappresenta una condizione essenziale per la comunicazione di conoscenze scientifiche ed epidemiologiche secondo un modello di tipo partecipativo, che favorisca iniziative di prevenzione e di promozione della salute.

Con il presente progetto si vuole sviluppare la consapevolezza circa l'opportunità di pianificazione del processo comunicativo sul rischio, si vogliono inoltre favorire interventi omogenei dal punto di vista informativo e operativo, garantiti dall'integrazione di competenze tecnico-scientifiche e di competenze comunicativo-relazionali.

La mortalità in Italia: descrizione e sorveglianza

I dati di mortalità costituiscono una delle fonti epidemiologiche più solide ed esaustive; vengono rilevati su tutto il territorio nazionale e sono codificati secondo criteri internazionali. Gli studi di mortalità generale e per la specifica causa iniziale che si intende perseguire sono i seguenti:

- 1) Analisi sistematica della mortalità generale e per le specifiche cause nello spazio (attraverso l'articolazione nei vari livelli territoriali, dalle macro aree alle città) e nel tempo (elaborando *trend* storici e analisi dei dati più recenti disponibili).
- 2) Sorveglianza della mortalità per monitorare e segnalare eventuali eccessi legati ad eventi peculiari (climatici o epidemici). Poiché non esiste nel nostro Paese un sistema che permetta di conoscere in tempo breve ed elaborare immediatamente con metodologia epidemiologico-

statistica i dati di mortalità a livello nazionale, si è avviato un sistema di sorveglianza attiva da attuare tutto l'anno presso le anagrafi delle città capoluogo di regione, da estendere gradualmente al maggior numero possibile di città capoluogo di provincia.

3) Mortalità Evitabile, suddivisa nei tre gruppi: evitabile con interventi di prevenzione primaria (patologie o cause violente legate al fumo di tabacco, all'abuso di alcool, ad errori dietetici, a comportamenti poco responsabili); evitabile con diagnosi e terapia precoci (tumori quali collo dell'utero, testicolo, malattia di Hodgkin); evitabile con interventi di assistenza sanitaria e sul disagio sociale.

4) Impatto delle varie patologie sulla mortalità prematura, attraverso lo studio degli anni di vita potenziale persi, metodo che quantifica le perdite in anni di vita umana causate dalle morti che avvengono prima di una certa età presa come *cut-off* (es. attesa di vita).

Risultati attesi nel triennio

Dalle linee di attività sopra descritte (si fa riferimento alla numerazione usata) si attendono i seguenti risultati:

1) Aggiornamento della descrizione della mortalità nel nostro Paese sulla base dei dati che verranno resi disponibili dall'ISTAT (nel triennio 2006-2008 dovrebbero essere forniti i dati della mortalità avvenuta dal 2003 al 2005-2006), attraverso la stesura dei *report* annuali e l'aggiornamento del Sito *Web* di Mortalità dell'ISS.

2) Conduzione della sorveglianza e *reporting* periodico dei risultati della mortalità osservata e di quella attesa sulla base di un congruo periodo precedente (3-4 anni), con particolare attenzione al periodo invernale, in relazione all'epidemia influenzale e a quello estivo, in relazione ai fatti climatici (eventuali ondate di calore)

3) Aggiornamento in senso temporale (con la considerazione degli anni più recenti) e spaziale (considerando vari livelli territoriali, dalle macro aree alle ASL) degli Atlanti di Mortalità Evitabile.

4) Aggiornamento e approfondimento dell'analisi degli Anni di Vita potenziale persi, con particolare riferimento alle patologie evitabili e a quello ad alto impatto economico-sociale.

Trasferibilità dei risultati

Poiché i risultati attesi si riferiscono ad argomenti di grande interesse e applicabilità immediata in tema di Sanità Pubblica e danno luogo a veri e propri "prodotti" fruibili, quali *report*, atlanti, siti *web*, la trasferibilità dei risultati del progetto è piuttosto elevata.

Linea guida per la valutazione e prevenzione degli incidenti domestici

Dall'analisi dei dati ISTAT sugli incidenti domestici condotta nel 1998 si stima che nel complesso gli incidenti domestici abbiano interessato in quell'anno 3.480.000 persone (il 53,2% della popolazione). Sono state coinvolte soprattutto le donne, gli anziani ma anche i bambini per i quali, come rileva l'Organizzazione Mondiale della Sanità, gli incidenti domestici rappresentano la prima causa di morte nei Paesi sviluppati.

L'indagine condotta dall'ISTAT ha mostrato che in Italia le cause principali degli incidenti domestici sono rappresentate dalle cadute (28,4% degli incidenti) e dall'utilizzo di utensili da cucina o da attività svolte in cucina (33%). Tra gli utensili di cucina il primo responsabile è il coltello che, da solo, è causa del 12,8 % di tutti gli incidenti.

Sulla base di quanto riportato al comma 1 dell'art. 5 della legge 493 del 03/12/99 il 18 Gennaio 2005 il Ministero della Salute – Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria ha siglato un accordo di collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità presso cui è operativo il Programma Nazionale delle Linee Guida per la stesura di una linea guida per la prevenzione delle cadute negli anziani.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di una linea guida sugli anziani basata sulla revisione sistematica della letteratura, prodotta da un *panel* di esperti multidisciplinari, condivisione della linea guida da parte di tutte le società scientifiche interessate al problema.

Trasferibilità dei risultati

La linea guida sarà contestualizzata per la realtà italiana. Sarà inviata alla Conferenza Stato Regione affinché articoli un programma di implementazione.

Metodi per lo studio della prevalenza dei tumori

A. Metodi di stima della prevalenza osservata a partire dai dati di incidenza e stato in vita raccolti nelle aree dei Registri Tumori: 1) applicazione e *test* del *software* SEER*Stat 2) metodi di correzione delle stime per l'inclusione dei casi persi al *follow-up*

B. Metodi statistici per la stima della prevalenza completa o totale, ovvero inclusiva dei casi sfuggiti alla casistica dei Registri perché diagnosticati anteriormente all'attività di registrazione (metodo dell'indice di completezza): 1) applicazione e *test* del *software* COMPREV per il calcolo dell'indice di completezza specifico per sede tumorale/sexo/paese 2) sviluppo di una teoria statistica per il calcolo dell'errore delle stime di prevalenza completa 3) sviluppo e applicazione di metodi alternativi per la stima della prevalenza completa, basati su modelli markoviani di malattia, che utilizzano dati aggregati di mortalità e sopravvivenza (Miamod) o di incidenza e sopravvivenza (Piamod)

C. Produzione di stime di prevalenza disaggregata per durata della malattia (2,5,10, x anni dalla diagnosi), per condizione prognostica (prevalenza di pazienti guariti e fatali), per condizione clinica (stato di malattia latente, stato diagnosi e primo trattamento, sorveglianza, trattamento per recidiva, fase terminale)

D. Stima della prevalenza per tumore e singolo stato federale negli Stati Uniti utilizzando la metodologia Miamod/Piamod (in collaborazione con NCI).

Risultati attesi nel triennio

Aggiornamento delle stime di prevalenza osservata e completa nelle aree dei Registri Tumore Italiani ed Europei aderenti al progetto EURO CARE-4.

Valutazione e comparazione delle diverse metodologie di stima della prevalenza completa disponibili. Completamento della metodologia di calcolo delle corrispondenti varianze campionarie.

Stima della prevalenza completa e disaggregata per durata per il tumore della mammella e per tutti i tumori per sesso e singolo stato federale negli Stati Uniti.

Trasferibilità dei risultati

Pianificazione delle risorse sanitarie a livello locale, regionale e nazionale.

Definizione di malattie rare e individuazione di *orphan drugs*.

Micronet- Sistema di allerta su isolamenti microbici

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 intende creare un sistema di sorveglianza basato su laboratori di microbiologia che inviano a cadenze stabilite informazioni sulle infezioni confermate in laboratorio in maniera automatica. Oggetto della sorveglianza sono sia gli eventi comuni che le infezioni emergenti o riemergenti.

Esso mira a diventare un sistema di interscambio di dati microbiologici all'interno del SSN. MICRONET potrà essere utilizzato come base di partenza per attuare a livello nazionale un sistema di sorveglianza epidemiologica basata sulle conferme di laboratorio che si estenderà da alcuni laboratori partecipanti a una rete più estesa dei laboratori esistenti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto vuole realizzare 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 a una sorveglianza a carattere nazionale.

un collegamento tra la rete dei laboratori ai 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.

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 e di costruzione di un *server* in grado di immagazzinare questi dati e fornirli in modo aggregato ai fruitori. Esso necessita anche dello sviluppo di uno schema che permetta di confrontare e aggregare i risultati di diverso tipo proveniente da realtà diverse. Esso si pone come punto di incontro tra dati già esistenti e la loro diffusione all'interno del 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.

Gli utenti destinati ad accedere al ritorno di informazioni sono tutti i livelli del SSN con differenziati livelli di accesso.

Migliorare le politiche di sanità pubblica in Europa tramite la modellizzazione matematica e la valutazione economica degli interventi per il controllo delle malattie infettive (Polymod)

L'uso dei modelli matematici rappresenta il principale strumento per prevedere l'impatto di differenti strategie di vaccinazione e controllo delle malattie infettive. Tuttavia, l'utilizzo di questi modelli non è prassi comune da parte dei decisori delle politiche sanitarie.

L'obiettivo principale di questo progetto, denominato Polymod, è quindi di fornire supporto agli organi che, delle diverse nazioni europee, sono responsabili delle politiche di vaccinazione, facilitando lo sviluppo, la standardizzazione e l'applicazione di modelli matematici di simulazione, valutazione del rischio e valutazione economica.

Il progetto si prefigge quindi di creare una piattaforma tra i *policy makers* e i loro consulenti nei singoli Stati Membri della UE, per definire quali siano i risultati dei modelli matematici

giudicati di maggiore importanza ai fini delle decisioni da intraprendere per implementare e valutare le strategie vaccinali.

Inoltre, il progetto ha l'obiettivo di stimare, attraverso la conduzione di indagini di popolazione in diversi Stati membri, alcuni parametri indispensabili che risultano di fondamentale importanza nell'implementazione dei modelli, tra cui: a) i parametri di contatto interpersonale per varie vie di trasmissione delle infezioni, e b) la sieroprevalenza di alcune infezioni prevenibili da vaccino nella popolazione generale.

Risultati attesi nel triennio

L'ISS partecipa come coordinatore di uno specifico *work-package* del progetto, mirato alla costituzione di una rete di referenti internazionali che fungono da consulenti dei *policy makers* nei paesi della UE. Sia nell'ambito di questo *work-package* che degli altri previsti dal progetto cui l'ISS prende parte come rappresentante italiano, si prevede di ottenere i seguenti risultati:

Collegamento tra modellisti e *policy makers* per identificare i bisogni prioritari dei decisori, e ottenere una più rapida risposta alle necessità di pianificazione.

Attuazione di una indagine standardizzata, comune alle altre nazioni partecipanti, che consentirà di disporre di una "matrice di contatti" calcolata su dati nazionali ed europei. La matrice di contatto rappresenta infatti il parametro più rilevante nella modellizzazione matematica nell'ambito delle malattie infettive e allo stato attuale delle ricerche esistono pochi studi in cui questa sia stata stimata direttamente, piuttosto che attraverso procedure di calcolo indiretto.

Disponibilità di dati di sieroprevalenza per alcune malattie infettive attraverso la conduzione di indagini mirate in Italia e nei vari Paesi europei.

Perfezionamento della modellistica matematica per una maggiore aderenza alle specifiche realtà nazionali.

Disponibilità di strumenti di previsione di diffusione delle infezioni nella popolazione generale.

Trasferibilità dei risultati

La disponibilità sul mercato di nuovi vaccini costituisce una importante risorsa per la sanità pubblica. D'altra parte, le diverse condizioni epidemiologiche delle varie nazioni, l'organizzazione dei servizi sanitari e le risorse economiche rendono necessario valutare caso per caso quali siano le migliori strategie vaccinali. I modelli matematici costituiscono in tal senso un ausilio fondamentale, tuttavia solo poche nazioni li utilizzano routinariamente. Il progetto Polymod avrà quindi importanti ricadute, facilitando l'identificazione dei principali risultati dei modelli da utilizzare nel processo decisionale e lo scambio con i modellisti. Attraverso lo studio della matrice dei contatti e della sieroepidemiologia, il progetto fornirà i parametri di base per la conduzione di modelli specifici per nazione. Infine, i risultati ottenuti saranno utilizzabili nella programmazione sanitaria italiana di interventi di prevenzione delle infezioni a trasmissione interpersonale.

Modelli di analisi della prescrizione farmaceutica a livello regionale

Tale attività, sviluppata all'interno di una convenzione fra ISS e Regione Umbria, ha permesso lo sviluppo di modelli per l'analisi della variabilità a livello di ASL e di *equipe* territoriale di medicina generale, la produzione di rapporti periodici sull'andamento dei consumi farmaceutici, e la conduzione di studi sul profilo di sicurezza dei farmaci.

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. L'attività è stata documentata in numerosi rapporti Istituzionali.

Trasferibilità dei risultati

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.

I modelli sviluppati nell'ambito di questa linea possono essere adattati e utilizzati nelle diverse realtà regionali.

I dati sull'uso dei farmaci nella popolazione dell'Umbria sono stati utilizzati come riferimento nell'ambito dell'attività regolatoria dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA).

Modelli Matematici per la Descrizione e il Controllo delle Epidemie: EPICO

La teoria matematica delle epidemie è un capitolo importante della dinamica di popolazione e ha una consolidata tradizione. Inoltre, come dimostrato negli ultimi vent'anni, la dinamica di trasmissione delle malattie infettive è un'area delle scienze applicate in cui l'uso di modelli matematici ha permesso grandi sviluppi, non solo dal punto di vista teorico, ma anche dal punto di vista della gestione delle politiche sanitarie.

I modelli matematici per le epidemie hanno infatti aiutato ad analizzare e controllare molti aspetti della dinamica delle malattie infettive, introducendo concetti come il numero riproduttivo di base (R_0), analizzando possibili cause di variazioni di incidenza, fornendo linee guida generali per le strategie di vaccinazione, nonché predizioni e valutazioni per le politiche di controllo.

Nonostante questi successi, molti problemi generali sono ancora aperti e l'applicazione della teoria a casi specifici richiede sempre uno sforzo modellistico speciale.

Per questo, è stata avviata una collaborazione sistematica e interdisciplinare tra il gruppo che opera nell'ambito dell'Istituto Nazionale di Alta Matematica dell'Università di Trento, il Reparto di epidemiologia delle malattie infettive del CNESPS, e specialisti di settori strettamente collegati come demografi e statistici. L'oggetto di questa collaborazione è la descrizione e il potenziale controllo delle epidemie e delle infezioni di maggiore importanza nel contesto italiano attuale, tramite l'uso di modelli matematici, formulati per varie malattie e confrontati con i dati reali.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca che si propone si svilupperà lungo le linee seguenti:

- sviluppo del quadro teorico della descrizione matematica delle malattie infettive, contribuendo al settore dell'epidemiologia matematica lungo le linee della ricerca internazionale;
- migliorare la comprensione di quei meccanismi epidemiologici (specialmente della configurazione dei contatti tra individui, in funzione di età e posizione geografica) che sono peculiari della dinamica di trasmissione di alcune malattie di grande interesse attuale per la sanità pubblica in Italia, e il confronto dei modelli con i dati;
- sviluppo di strumenti di simulazione flessibili, basati su dati epidemiologici reali, per comprendere e controllare l'evoluzione di malattie infettive nel contesto italiano.

Dal punto di vista modellistico, verrà considerato il legame tra la trasmissione dell'infezione e le strutture demografiche (età, spazio), prendendo in considerazione aspetti demografici realistici e i cambiamenti previsti nelle strutture demografiche stesse.

Per ciò che riguarda lo studio di malattie specifiche nel contesto italiano, saranno considerate soprattutto le malattie prevenibili tramite vaccinazione (come morbillo, parotite, rosolia,

pertosse, varicella e influenza) allo scopo di migliorare la conoscenza dei meccanismi di trasmissione e affrontare specifici problemi di politica sanitaria.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto consentirà di applicare i risultati dei modelli di trasmissione delle malattie infettive a problemi concreti, fornendo strumenti (da strategie ottimali di vaccinazione ad analisi di scenario) di interesse per la sanità pubblica a livello nazionale.

Inoltre, contribuirà allo sviluppo della teoria matematica delle epidemie, fornendo, anche sulla base dei problemi emersi nell'applicazione a malattie specifiche, metodi e risultati nuovi di interesse scientifico generale.

Infine, il progetto persegue un obiettivo rilevante nella costruzione di una collaborazione sistematica stabile tra il gruppo matematico operante all'Università di Trento e l'ISS, in modo da rafforzare il legame tra ricerca matematica, demografica e statistica e la gestione delle politiche sanitarie pubbliche. Nell'ambito di questa collaborazione, il progetto promuoverà la crescita scientifica professionale di giovani ricercatori in un campo di interesse per le istituzioni pubbliche.

Nuove strategie per lo sviluppo di un vaccino profilattico e terapeutico per l'infezione da Virus dell'Epatite C

La più saliente caratteristica dell'infezione da HCV è il suo altissimo tasso di progressione verso la cronicizzazione (80-85% delle infezioni acute). L'epatite cronica C nel 20-30% dei casi evolve in cirrosi e un epatocarcinoma può svilupparsi nell'1-4% per anno dei pazienti con cirrosi. La terapia con antivirali dei pazienti in fase cronica fornisce ancora modesti risultati, mentre il trattamento dei pazienti in fase acuta è ostacolato dalla frequente asintomaticità di questa. Quindi, la ricerca di un vaccino per la prevenzione dell'infezione da HCV rappresenta 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. La sperimentazione dei potenziali candidati vaccini finora sviluppati non è andata oltre la fase preclinica, inoltre, nella maggior parte dei casi, la loro efficacia non è stata testata, data la non facile disponibilità di scimpanzé.

Gli obiettivi principali dell'attività di ricerca proposta nell'ambito di questo progetto comprende:

Studio prospettico dei fattori virali e dell'ospite nel corso dell'infezione acuta da HCV.

Analisi della risposta immunitaria cellulo-mediata e definizione di correlati immunologici di risoluzione o cronicizzazione dell'infezione acuta.

Generazione di un candidato vaccino di tipo genetico per il trattamento profilattico e terapeutico dell'infezione da HCV e studio dell'efficacia profilattica del candidato vaccino nel modello dello scimpanzé tramite vaccinazione e *challenge*.

Studio di fattibilità di un *trial* clinico di efficacia per la vaccinazione profilattica contro l'Epatite C.

Risultati attesi nel triennio

Un nostro precedente studio stabilì che il sesso femminile e una risposta immune cellulare vigorosa e multispecifica sono correlati con la risoluzione dell'infezione acuta. L'analisi di un numero maggiore di individui e per un più lungo periodo di tempo permetterà di definire meglio la storia naturale dell'infezione e fornirà gli elementi di conoscenza necessari per la generazione di un efficace vaccino anti-HCV.

I risultati dello studio preliminare suddetto fanno ritenere anche necessario estendere lo studio della risposta immunitaria cellulo-mediata attraverso l'esecuzione di ulteriori saggi in

individui con infezione acuta seguiti per 12 mesi (IFNg ELIspot ; IFNg ICS; Analisi dei Tetrameri solubili, *test* di incorporazione di BrdU),

I risultati permetteranno di definire un chiaro correlato immunologico per la risoluzione dell'infezione, fondamentale per la realizzazione di un vaccino in grado di indurre una risposta cellulare forte, duratura e multispecifica.

Il candidato vaccino sarà di tipo genetico, codificante per la regione NS, utilizzando vettori adenovirali e/o DNA plasmidico.

Il vaccino sarà inoculato in 5 scimpanzè (in 5 si userà *placebo*) in cui sarà misurata la risposta immunitaria come sopra riportato a diversi tempi dall'immunizzazione. L'infezione sperimentale e degli animali e il loro *follow-up* consentirà di valutare l'efficacia del vaccino.

Al fine di valutare la fattibilità di un *trial* nell'uomo sarà condotto uno studio di coorte utilizzando il vaccino anti-HBV su una popolazione di tossicodipendenti

Uno tale studio può consentire di stimare: 1) rischio d'infezione in questa categoria; 2) l'accettabilità dell'intervento e l'adesione al *follow-up*; 3) costi e l'organizzazione logistica di un *trial*.

Trasferibilità dei risultati

Allo stato attuale non esistono composti o un vaccino in grado di curare o prevenire l'infezione da HCV. La terapia più recente che impiega l'associazione Peg-IFN e ribavirina può portare a una risposta antivirale nel 54% dei soggetti (42% per il genotipo 1). Tassi di guarigione più alti si osservano nel trattamento dell'infezione acuta ma questa nella grande maggioranza dei casi asintomatica e non riconosciuta. Queste terapie sono molto costose e inducono gravi effetti collaterali. In questo quadro, un razionale approccio per il trattamento dell'infezione da HCV è lo sviluppo di un vaccino efficace. Il presente progetto costituisce la base per un eventuale *trial* nell'uomo. L'uso del vaccino, anche se solo limitato ad alcune categorie a più alto rischio d'infezione, come ad esempio i tossicodipendenti, gli operatori sanitari, ecc., contribuirà col tempo a ridurre l'incidenza dell'infezione acuta e ridurrà il l'enorme serbatoio d'infezione rappresentato da soggetti cronici. Il vaccino potrà inoltre essere usato anche a scopo terapeutico, per la prevenzione della cronicizzazione, da solo o in associazione a farmaci antivirali.

Piano per la sorveglianza delle esposizioni ad agenti pericolosi e delle sindromi associate, basato sul contributo dei Centri Antiveleni

Le esposizioni accidentali ad agenti pericolosi e le manifestazioni cliniche che da essi derivano, possono essere considerate eventi prevenibili da sottoporre ad attenta osservazione per indirizzare appropriati interventi sanitari. Inoltre, la disamina sistematica di alcuni di questi eventi e/o delle sindromi associate assumono attualmente un particolare interesse per la tempestiva individuazione e il contenimento di possibili attacchi terroristici di tipo chimico o biologico coperti o in fase di preparazione. Nel loro insieme, le esposizioni ad agenti pericolosi e/o gli effetti che da queste derivano vengono riferiti in modo selettivo ai Centri Antiveleni (CAV), il cui compito è fornire consulenze specialistiche per una corretta diagnosi e gestione delle intossicazioni acute. Il presente progetto ha l'obiettivo di definire un modello di sorveglianza basato sulle osservazioni effettuate dai CAV in grado di contribuire alla rilevazione tempestiva di sindromi associabili al rilascio accidentale o intenzionale di agenti pericolosi.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi nel corso dell'attività pianificata comprendono:
 identificazione e definizione di un *set* minimo di dati di rilevazione comune tra i diversi CAV di interesse per il sistema di sorveglianza proposto

definizione di un prototipo di un sistema di rilevazione, archiviazione e analisi delle informazioni di interesse accessibile in rete

selezione degli agenti e delle manifestazioni sindromiche di interesse per la sorveglianza di eventi anomali riferibili a potenziali attacchi terroristici coperti o in fase di preparazione di tipo chimico, biologico o radiologico

standardizzazione delle procedure per la valutazione e la classificazione degli eventi selezionati (esposizioni e sindromi), ai fini della tempestiva identificazione di eventi anomali riferibili a potenziali attacchi terroristici

stima di frequenze attese per un selezionato gruppo di eventi (esposizioni e quadri sindromici) riferibili a potenziali attacchi terroristici

Trasferibilità dei risultati

Le attività svolte consentiranno di procedere a una sorveglianza degli eventi anomali riferibili al rilascio volontario e accidentale di sostanze pericolose e di allertare per opportune verifiche i referenti nazionali e locali; i risultati ottenuti potranno essere utilizzati anche per la definizione di un sistema di sorveglianza a carattere generale in grado di integrare e analizzare tempestivamente la casistica proveniente dai diversi CAV attivi sul territorio nazionale.

I risultati ottenuti potranno essere utilizzati per la definizione di una rete dei Centri antiveleni in grado di garantire un sistema di sorveglianza sull'insieme delle cause di intossicazione considerate

Profili di beneficio/rischio nella pratica clinica reumatologica e dermatologica

L'attività rientra nella categoria della *outcome research* e si basa sull'integrazione delle informazioni, raccolte da due reti attive sul territorio nazionale in campo reumatologico e dermatologico (Antares e Pso-Care), sui farmaci "biologici" con particolare riguardo agli anti TNF α . Lo studio intende valutare e confrontare l'impiego dei farmaci biologici (anti-TNF, antagonista dell'IL1, anti-CD11a) nella popolazione generale in termini di sicurezza, efficacia e appropriatezza clinica e in particolare si prefigge di monitorarne la tossicità nel breve e lungo termine con specifica attenzione alla possibile emergenza di patologie infettive e allo sviluppo di neoplasie.

Risultati attesi nel triennio

Valutare i profili di cura e identificare i fattori che determinano la decisione circa il trattamento con farmaci biologici nelle diverse condizioni patologiche in studio.

Descrivere gli esiti a lungo termine del trattamento e il profilo di sicurezza confrontando la resa di strategie assistenziali differenti.

Studiare i fattori prognostici per la risposta al trattamento e identificare gruppi specifici di pazienti con la migliore risposta (*best responders*) e quelli a rischio più elevato di cura inappropriata o di esiti sfavorevoli.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazione di *report* periodici sull'andamento dello studio

Organizzazione di seminari di aggiornamento

Relazioni a convegni e pubblicazioni scientifiche.

Progetti gestionali per le patologie a maggiore impatto sociale con il coinvolgimento del volontariato

Il corpo centrale di questo progetto è il coordinamento della componente valutativa di iniziative di associazioni di volontariato registrate come Onlus per quanto riguarda le seguenti tematiche:

interventi psicoeducativi familiari;
inserimento lavorativo di pazienti psichiatrici;
formazione nel campo della valutazione di efficacia degli interventi;
depressione *post-partum*;
disturbi alimentari psicogeni.

Sono coinvolte nel progetto 14 unità operative tra cui 3 unità dell'Istituto Superiore di Sanità.

Il compito dell'unità di coordinamento è essenzialmente di tipo metodologico per quanto riguarda i disegni degli studi valutativi, l'approntamento di strumenti di valutazione, la definizione di indicatori di processo e di esito e l'analisi statistica dei dati raccolti. Particolarmente seguiti saranno i progetti relativi all'*evidence-based mental health*, agli interventi psicoeducativi e a quelli relativi alla depressione post-natale.

L'unità si propone di coinvolgere nel progetto anche le associazioni di familiari/pazienti, che non sono titolari di unità operative specifiche.

Risultati attesi nel triennio

Alla fine del progetto ci si aspetta di constatare:

la diffusione di interventi psicoeducativi familiari con valutazione della loro efficacia nella pratica;

l'effettuazione di iniziative di inserimento lavorativo da parte di associazioni di volontariato con individuazione degli approcci più promettenti;

il miglioramento delle conoscenze dei rappresentanti delle associazioni di volontariato per quanto riguarda i principi di *evidence-based medicine* applicata gli interventi psichiatrici, in particolare di quelli di tipo psicosociale;

la messa a punto di una metodologia di *screening* nelle donne a rischio per la depressione *post-partum*.

Forse però il principale risultato sarà la sensibilizzazione delle associazioni di volontariato alla opportunità di valutare in modo rigoroso gli interventi da loro effettuati e l'aumento della loro capacità di distinguere tra interventi di diversa efficacia proposti dai servizi pubblici e privati.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto stesso è un progetto di trasferimento alle associazioni di volontariato di "tecnologie" già esistenti. Ciò non esclude però che da questo progetto possano derivare nuove conoscenze che possano arricchire il repertorio di interventi efficaci per la tutela della salute mentale.

Progetto "OSCAR per la Qualità" Outcome Survey sui Centri che eseguono Angioplastiche coronariche: Risultati a un anno per valutare la Qualità

L'angioplastica coronarica ha acquisito una importanza crescente nel trattamento della cardiopatia ischemica che risulta tuttora la causa più frequente di morte in Italia per le forme acute (infarto miocardio e morte improvvisa) e croniche (esiti delle forme acute con deterioramento della funzione ventricolare e scompenso cardiaco). La grande potenzialità dell'angioplastica in termini di efficacia terapeutica per i pazienti con cardiopatia ischemica deve essere garantita da strutture ad elevata attività per ottimizzare i risultati e l'impiego delle risorse. Da ciò consegue la grande importanza di poter verificare se i diversi centri sono in grado di garantire l'efficacia delle prestazioni fornite.

Il presente studio ha pertanto la finalità di verificare e comparare la qualità dei Centri di Cardiologia Invasiva per la efficacia terapeutica delle procedure interventistiche coronariche percutanee sviluppando un metodo obiettivo di valutazione dei risultati delle prestazioni fornite.

Si tratta quindi di mettere a punto uno strumento di valutazione della Qualità delle cure della Cardiologia Invasiva definendo e validando i criteri di *risk adjustment* per l'angioplastica coronarica e valutando l'affidabilità dei meccanismi "amministrativi" automatici per il riscontro di eventi sensibili nel *follow-up*.

Lo studio avrà una durata complessiva di 30 mesi, con un periodo di arruolamento di almeno 6 mesi.

Risultati attesi nel triennio

Verranno costruiti due modelli separati di aggiustamento del rischio: il primo per le procedure di angioplastica (PCI) condotte in elezione e il secondo per quelle non in elezione, queste ultime definite come procedure condotte in emergenza.

Gli *endpoint* dello studio saranno:

- per l'infarto miocardico acuto (STEMI <24h) la mortalità intraospedaliera, a 30 gg e a 6 mesi dalla procedura
- per le altre procedure (SCA NSTEMI e cardiopatia ischemica cronica) un unico *end point* combinato di morte, infarto miocardico e nuove rivascolarizzazioni a 6 mesi

Nello STEMI <24h la mortalità intraospedaliera risulta certamente l'indicatore più semplice, e può essere considerato sufficientemente affidabile per valutare l'efficacia del trattamento con angioplastica primaria; più adeguato resta l'indicatore a 30 gg. Verrà comunque considerata anche la mortalità a 6 mesi.

Per analisi sugli esiti complessivi dell'angioplastica e per valutazioni comparative fra i Centri per le procedure elettive o urgenti risulta più appropriato l'utilizzo dell'*end point* combinato di morte, infarto miocardico e nuove rivascolarizzazioni a 6 mesi, che tiene conto sia dei pochi eventi avversi ospedalieri sia delle più frequenti conseguenze cliniche a breve e medio termine della ristenosi con le relative conseguenze in termini di complicanze cliniche e nuove rivascolarizzazioni.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto oltre ad essere utili alla società scientifica e ai singoli professionisti per le loro valutazioni interne relativamente alla qualità delle prestazioni fornite ai cittadini, saranno di fondamentale importanza sia per le Regioni sia per il Ministero della Salute nella stesura dei propri piani di attività.

Anche il cittadino potrà usufruire delle informazioni derivanti da questo progetto per arrivare a compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dal Sistema Sanitario Nazionale.

Progetto Diabete: IGEA – Integrazione, Gestione e Assistenza

La crescente dimensione del problema e la consapevolezza che un attento *follow-up* e un trattamento efficace possono migliorare lo stato di salute delle persone con diabete hanno indotto il Ministero della Salute a inserire il diabete fra le quattro priorità sanitarie nazionali su cui concentrare le attività del Piano nazionale di prevenzione attiva.

Nell'ambito di tale attività è stato avviato il progetto IGEA per l'attuazione di programmi di *disease management* per la patologia diabetica.

Obiettivo generale del progetto è valutare se la gestione integrata della patologia diabetica è attuabile, migliora la compliance al *follow-up* e ai trattamenti e riduce gli esiti sanitari a breve e a lungo. Obiettivi specifici:

- attuare le tecniche di gestione della malattia in varie realtà territoriali;
- valutare l'accettabilità, i punti critici e i fattori di successo;
- verificare l'effetto sul controllo glicemico;
- verificare l'effetto sulle complicanze micro e macrovascolari.

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 in particolare:

- revisione e aggiornamento continuo delle Linee guida per la gestione integrata della patologia diabetica secondo il modello del *disease management* e sulla base delle più recenti evidenze scientifiche;

- aumento della proporzione di diabetici con periodica determinazione di HbA1c, valutazione del profilo lipidico, misurazione della pressione arteriosa, monitoraggio per nefropatia, retinopatia, neuropatia;

- miglioramento del controllo della glicemia, del profilo lipidico, della pressione arteriosa e degli altri indicatori di esito intermedio;

- aumento dei diabetici che smettono di fumare, e di quelli che praticano attività fisica;

- riduzione dei ricoveri in ospedale e degli accessi al Pronto Soccorso.

Trasferibilità dei risultati

- Pubblicazione di *report* periodici sull'andamento dello studio

- Predisposizione di uno spazio *web* dedicato alla gestione integrata del diabete rivolto sia ai professionisti sia ai pazienti.

- Predisposizione di pacchetti formativi e di un piano di formazione per la gestione integrata della patologia diabetica.

- Organizzazione di seminari di aggiornamento e di convegni annuali sulla gestione integrata della patologia diabetica secondo il modello del *disease management*.

- Relazioni a convegni e pubblicazioni scientifiche.

Progetto Kosovo

Obiettivo del progetto è costituire strumenti di sorveglianza del personale militare in missione nel Kosovo e Bosnia-Erzegovina per rischio di tumore. In particolare:

- adottare metodi tipici di registrazione dei tumori e definire l'attività come un vero e proprio registro tumori di popolazione

- migliorare la specificità della diagnosi attraverso la ricerca delle cartelle dei soggetti segnalati e la verifica diagnostica

- migliorare la completezza della registrazione attraverso la ricerca attiva dei casi di cancro nella coorte in studio

- controllare se la sensibilità della segnalazione per i casi esposti sia maggiore rispetto ai non esposti, ricorrendo a fonti esterne e confrontando con metodi di tipo cattura-ricattura

- migliorare l'analisi statistica

- migliorare la definizione della popolazione in studio

- produrre stime indipendenti dei casi attesi nella popolazione militare per valutare la completezza. Produrre stime di prevalenza dei tumori tra la popolazione militare a scopi di valutazione e programmazione delle risorse sanitarie necessarie

- ricercare lo stato in vita dei casi diagnosticati per attivare studi di sopravvivenza dei malati;

- collegare il registro tumori militare con la rete dei registri tumori italiani

- produrre una nuova valutazione del possibile rischio di tumori per il personale impegnato nei Balcani, sulla base dei dati del registro tumori militare, validati e controllati

- dare visibilità e qualità ai protocolli e ai risultati.

Risultati attesi nel triennio

Istituzione di un vero e proprio registro tumori militare, esteso a tutta la popolazione militare italiana, per il periodo 1995-2005, controllato e validato con i metodi propri dei registri tumori di popolazione.

Un manuale di registrazione ad uso del registro per il consolidamento delle attività.
Collegamento del registro tumore militare con la rete dei registri tumori italiani.
Una indagine campionaria sullo stato di salute del personale militare
Protocollo di uno studio di coorte sul rischio di tumore comparativo tra i militari che sono stati impegnati in Kosovo e Bosnia-Erzegovina
Risultati dello studio sulla valutazione del rischio di tumore per i militari in missione resi pubblici e divulgati.
Attività di controllo anche successiva alla fine formale del progetto sul funzionalità dello strumento Registro Tumori militare per il futuro

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio di coorte sul rischio di tumore per i militari in missione contribuirà alla conoscenza sul problema.

I dati del registro tumori militare rappresentando una popolazione più giovane di quella generale e un base geografica vasta in Italia e particolarmente di tipo Centro-Sud, risultano integrativi al quadro epidemiologico dei tumori in Italia dato dai Registri tumori esistenti.

Promozione della salute mentale nella scuola

Si intende mettere a punto e sperimentare un manuale destinato agli studenti delle prime classi superiori e rivolto a promuovere le loro competenze individuali e sociali soprattutto per quanto riguarda la:

- definizione di obiettivi e la pianificazione del loro raggiungimento;
- abilità di comunicazione interpersonali, inclusa assertività;
- gestione di conflitti e controllo degli impulsi.

Si ritiene, anche sulla base di un'analisi della letteratura, che si tratta di competenze che dovrebbero essere comuni a tutti gli interventi di comunicazione di salute mirati a temi specifici, ad esempio educazione alimentare o sessuale, uso di alcol e droga, ecc.

Verrà realizzato anche un manuale rivolto a insegnanti o a pari per l'applicazione interattiva del manuale per gli studenti.

In relazione ai finanziamenti che sarà possibile ricevere, l'approccio verrà sperimentato in alcune scuole mediante un disegno controllato a *cluster* con alcune classi assegnate al "trattamento" e altre mantenute come controllo.

Risultati attesi nel triennio

Tra i primi risultati vi è indubbiamente la disponibilità dei due manuali suddetti, che verranno elaborati in modo da poter essere entrambi applicati con facilità e in modo da promuovere la partecipazione attiva. La sperimentazione dei manuali potrà consentire di valutare la loro efficacia 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.

Trasferibilità dei risultati

Proprio per l'impostazione scelta (applicazione di un manuale rivolto direttamente agli studenti), l'approccio, se efficace, potrà essere facilmente esteso a tutte le scuole, anche in quelle in cui il corpo docente non sia particolarmente interessato e motivato.

Qualità dell'aria e salute: sperimentazione di un'azione a Roma

Obiettivo è quello di sviluppare, e sottoporre a sperimentazione con valutazione degli esiti, una "azione" nella città di Roma per la riduzione delle concentrazioni di polveri fini e ultra fini entro i limiti della direttiva Europea, e del rispetto dell'impegno preso per il trattato di Kyoto.

Obiettivi specifici riguardano:

Studio della mortalità a breve e lungo termine sull'area di Roma per quartieri, comparativa con tutta la città, provincia, regione, correggendo per i maggiori confondenti (sesso, età, abitudine al fumo).

Caratterizzazione di livelli e sorgenti per frazioni dimensionali a Roma, per area e per anno di calendario.

Valutazione *in vitro* di effetti citotossici del particolato, per area e composizione.

Recupero informazione e analisi per la caratterizzazione storica del parco di vetture circolanti e dei flussi sull'area di Roma e sviluppo di modelli di diffusione nell'aria.

Deduzione di scenari di esito e definizione di indicatori di valutazione degli esiti.

Definizione e sperimentazione di un'azione di controllo delle emissioni e della concentrazione di polveri sull'area di Roma, in collaborazione con il Comune di Roma, di indicatori di esito specifici e misurabili.

Il progetto coinvolge tre Dipartimenti all'interno dell'ISS, precisamente il CNESPS, il Dipartimento di Ambiente e il Dipartimento di Tecnologie e Salute, il comune di Roma (Assessore all'Ambiente) e si compone di 8 U.O. e una unità di coordinamento generale.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono i numerosi vantaggi che deriverebbero dal progetto:

Trasporti pubblici. Aria più pulita, meno rumore, più *comfort* dei passeggeri, aria meno maleodorante, minore annerimento di monumenti e palazzi.

Taxi. Minor prezzo, più disponibilità, maggiore uso di taxi e minore uso di auto private, (perché non dovremmo prendere un taxi per andare a teatro e a cena senza problema di parcheggi e potendo bere alcolici?), più silenziosi, più lavoro per più tassisti.

Promozione di auto da città. Promozione per il rinnovo del parco macchine con veicoli da città piccoli elettrici, a gas, a benzina, ibridi, ecc., con minori consumi, minore inquinamento, maggiore facilità di parcheggio, lotta al parcheggio selvaggio. Azione doverosa capace di fluidificare il traffico con grande vantaggio per tutti, necessità di molti più vigili urbani e controllori.

Eliminazione diesel dalle zone ZTL. Miglioramento della qualità dell'aria al centro della città per cittadini e turisti, promozione dell'ammodernamento e della trasformazione di mezzi di trasporto merci a gas naturale per poter entrare nelle zone critiche, nascita di attività di trasporto pulito all'interno della città. Eliminazione diesel dalle zone all'interno dell'anello ferroviario. Spinta finale verso la eliminazione dell'accesso dei mezzi a trazione diesel a Roma, privati, pubblici, trasporto merci e pullman turistici.

Trasferibilità dei risultati

L'azione definita e messa a punto sull'area di Roma diviene un modello replicabile in altre grandi città con problemi simili.

Raccolta e analisi di campioni biologici da militari di contingenti italiani impegnati in missioni di pace in Iraq (SIGNUM)

L'indagine ha lo scopo di accertare i livelli di U presenti in campioni biologici di militari impegnati in zone d'operazione in Iraq in relazione all'uso di armi con U impoverito, (*Deplete Uranium DU*).

Lo studio prevee la misura di elementi chimici o di *marker* genotossici/danno al DNA nei campioni biologici, prima e dopo l'impiego in missione, come misura dell'effettiva esposizione dei soggetti. Lo studio mira a:

1. verificare

esistenza di concentrazioni significative di DU e/o elementi tossici (quali As, Cd, Mo, Ni, Pb, V e W) in campioni di urine, siero e capelli prelevati prima e dopo l'impiego in missione.

esistenza di danni citogenetici, su sangue intero eparinato, su una quota rappresentativa della popolazione militare in esame (100 unità).

esistenza di alterazioni nucleotidiche ossidative (8-idrossi-2'-desossiguanosina: 8-OH-dG) e di addotti al DNA rilevabili con postmarcatura con 32P.

2. conservare per almeno 30 anni:

un controcampione di urine, capelli, siero, acidi nucleici estratti, appartenenti a tutta la popolazione militare in esame, per eventuali esigenze medico-legali;

un controcampione di linfomonociti, disponibili per eventuali indagini future.

un controcampione di acidi nucleici (DNA e RNA) estratti da linfomonociti e congelati, per indagini successive biomolecolari.

3. mantenere sotto osservazione la popolazione esaminata, con accertamenti periodici, clinici e laboratoristici, secondo i protocolli già definiti.

Risultati attesi nel triennio

1) Risultati sulla determinazione di ciascun *marker* genotossico da parte di ciascun centro di analisi dei campioni rilevati

2) Integrazione dei risultati dei singoli centri di analisi in una analisi unificata con revisione di tutti i dati parziali e conclusioni sulla rilevazione di tracce di Uranio (ed eventualmente di altri elementi potenzialmente tossici, quali As, Cd, Mo, Ni, Pb, V e W) presenti in campioni biologici di militari impegnati in zone d'operazione in Iraq dove presumibilmente si è fatto uso di armi contenenti U impoverito.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio di coorte sul rischio di tumore per i militari in missione contribuirà alla conoscenza sul problema.

Base di misure biologiche di esposizione per studi successivi.

Registro Italiano Stenting Carotideo (RISC-2)

Il Registro Italiano per lo *Stenting* Carotideo (RISC) è stato proposto da specialisti di diverse discipline che si occupano del trattamento delle lesioni della biforcazione della carotide per la prevenzione dell'*ictus*. Dopo un primo progetto pilota chiamato RISC (Registro Italiano per lo *Stenting* Carotideo) che ha avuto il merito di coinvolgere quattro società e gruppi di lavoro tra loro differenti (Chirurghi Vascolari, Radiologi, Neuroradiologi e Cardiologi) e che ha permesso di valutare la procedura di *stenting* carotideo su circa 1200 casi arruolati, il Gruppo RISC ha deciso di avviare il RISC-2 con l'obiettivo di:

monitorare le procedure di *stenting* carotideo sul territorio nazionale;

descrivere e analizzare gli esiti della procedura di *stenting* carotideo, in termini di complicanze neurologiche e di mortalità, utilizzando indicatori grezzi e aggiustati per la gravità dei pazienti;

confrontare gli esiti di questa procedura con quelli della procedura chirurgica TEA in base a dati disponibili in letteratura;

registrare l'impatto che i sistemi di protezione, dove impiegati, hanno sulla riduzione del rischio in relazione anche alla tipologia della placca.

Per il RISC-2, inoltre, è stata stabilita una stretta collaborazione con il progetto Mattoni-*Outcome*, avviato dal Ministero della Salute per la misura sistematica di *outcome* dei servizi sanitari.

Ogni centro partecipante al RISC-2 si impegnerà ad arruolare pazienti per almeno 6 mesi consecutivi. La raccolta dati per lo studio RISC-2 inizierà ufficialmente dal mese di Gennaio 2006 e durerà due anni.

Risultati attesi nel triennio

Gli *end-point* dello studio sono:

Esiti peri e post procedurali: complicanze neurologiche (TIA, STROKE) e/o decesso che si verificano entro 48 h dall'intervento.

Esiti neurologici (TIA, STROKE) e/o decesso che si verificano entro 30gg dalla procedura.

Per un sottocampione di pazienti, monitoraggio del titolo anticorpale anti- *C. pneumoniae* e anti -HSP60 ricombinante di *C. pneumoniae* prima, dopo 30 giorni e ad un anno dalla procedura.

Il RISC-2 ha inoltre l'obiettivo di effettuare un'analisi comparativa degli esiti di *stenting* carotideo eseguiti dai vari specialisti (chirurghi vascolari, cardiologi, radiologi, neuroradiologi, ecc.) presenti nelle strutture distribuite sul territorio nazionale, tenendo in considerazione parametri legati non solo alla percentuale di stenosi e alla presenza o assenza di sintomi, ma anche, e fondamentalmente, a quelli relativi alla composizione della placca e ai fattori di rischio, e quindi alla gravità del paziente.

È prevista la costruzione di adeguati modelli di *risk-adjustment* per la valutazione dei singoli *end-point* previsti che considereranno gli specifici fattori che potrebbero agire come confondenti e/o modificatori di effetto.

Sono previste analisi stratificate per:

area geografica (nord, centro, sud),

gruppi di centri clinici definiti da comuni caratteristiche strutturali e/o organizzative (i.e. volumi di attività, dotazioni strutturali, ecc.),

utilizzo o meno di protezione cerebrale

livello socio-economico dei pazienti,

materiali usati per la procedura.

Si procederà, quindi, alla costruzione di diversi tipi di indicatori (tassi grezzi, tassi attesi, tassi aggiustati per rischio).

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto oltre ad essere utili alle quattro società scientifiche coinvolte e ai singoli professionisti per le loro valutazioni interne relativamente alla qualità delle prestazioni fornite ai cittadini, saranno di fondamentale importanza per i decisori politici, sia a livello regionale sia a livello centrale nella preparazione dei propri piani di attività.

Anche il cittadino potrà trarre vantaggio dalle informazioni prodotte nell'ambito di questo progetto per arrivare a compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dal Sistema Sanitario Nazionale.

REPROSTAT 2

REPROSTAT è parte dell'”*Health Monitoring Program*” della Commissione Europea. Il progetto ha l'obiettivo di valutare l'utilità di un *set* di indicatori sulla salute sessuale e riproduttiva, con particolare enfasi sulla salute riproduttiva degli adolescenti e dei giovani adulti. Il progetto, al contrario di REPROSTAT 1, coinvolge tutti i paesi membri dell'Unione Europea allargata.

Risultati attesi nel triennio

Revisione degli indicatori sulla salute riproduttiva prodotti nell'ambito del progetto REPROSTAT 1 e verifica della loro applicabilità nei paesi dell'Unione Europea allargata.

Messa a punto di un compendio sulla salute sessuale e riproduttiva nei paesi membri dell'UE.

Revisione sistematica dei fattori associati e in grado di ridurre il rischio di gravidanza e di malattie a trasmissione sessuale tra gli adolescenti.

Disegno e implementazione di un'indagine sulla salute riproduttiva tra gli adolescenti.

Promozione e diffusione dei risultati per lo sviluppo di politiche e la disponibilità di servizi sanitari.

Produzione di materiale sulla promozione della salute.

Trasferibilità dei risultati

La lista degli indicatori di salute riproduttiva potrà essere adottata per la valutazione delle attività connesse al settore.

Rete nazionale di sorveglianza sentinella delle sindromi influenzali

L'influenza costituisce un importante problema di Sanità Pubblica a causa della ubiquità, contagiosità, e variabilità antigenica dei virus influenzali, dell'esistenza di serbatoi animali e delle possibili gravi complicanze. Frequente motivo di consultazione medica e di ricovero ospedaliero, e principale causa di assenza dal lavoro e da scuola, l'influenza è ancora oggi la terza causa di morte in Italia per patologia infettiva, preceduta solo da AIDS e tubercolosi.

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.

Poiché durante il primo anno di sorveglianza la rete sentinella si è dimostrata uno strumento essenziale per descrivere l'andamento della sindrome influenzale e poiché l'influenza continua a costituire un rilevante problema di sanità pubblica, a partire dalla stagione 2000-2001, la sorveglianza sentinella è passata da una fase sperimentale ad una fase istituzionale.

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), dei Medici di medicina generale e dei Pediatri di libera scelta, dei Laboratori Universitari di riferimento e viene coordinata dal Ministero della Salute.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo generale del sistema di sorveglianza dell'influenza è quello di costituire una base di dati per valutare in modo comparativo l'incidenza dell'influenza nel corso degli anni.

Obiettivi specifici

- descrivere in termini di spazio, tempo e persona i casi di sindrome influenzale osservati da un campione di medici sentinella del Servizio Sanitario Nazionale;
- stimare la settimana di inizio, la durata e l'intensità dell'epidemia influenzale;
- stimare i tassi di incidenza per settimana nella stagione influenzale;
- stimare i tassi di incidenza per le fasce di età 0-4, 5-14, 15-64, 65 e oltre;
- stimare la frequenza di soggetti vaccinati tra i casi di sindrome influenzale di età pari o superiore a 65 anni;
- valutare la presenza di gradienti geografici di diffusione, da utilizzare in modelli per la previsione di un'eventuale pandemia;
- stimare settimanalmente la frequenza di ospedalizzazione tra i casi di influenza

Trasferibilità dei risultati

Il sistema di sorveglianza si è confermato negli anni uno strumento valido per il rilevamento settimanale dell'incidenza dell'influenza, l'identificazione tempestiva dei picchi epidemici stagionali e per la diffusione delle informazioni alla popolazione.

Con il presente progetto, si vogliono quindi consolidare le attività esistenti e integrarle con le nuove, in modo da ottenere ulteriori dati epidemiologici che consentano di valutare il "burden of diseases" dell'influenza e valutare l'impatto di sanità pubblica della strategia vaccinale antinfluenzale.

Rete per il controllo delle malattie infettive nel Sud Europa e nei Paesi dell'area del Mediterraneo (EpiSouth)

Le malattie infettive, così come le azioni di bioterrorismo, non conoscono confini geografici. I paesi dell'area del Mediterraneo hanno confini marittimi comuni nel rimarcabile ecosistema del Mar Mediterraneo e, come conseguenza, condividono problemi comuni di sanità pubblica. Inoltre, una parte significativa di cittadini dei Paesi europei proviene da paesi del Nord Africa, dei Balcani o del Medio Oriente e l'immigrazione da queste aree è ancora in corso.

Lo scopo generale di tale progetto, denominato EpiSouth, è di creare un quadro di collaborazione su questioni epidemiologiche per migliorare la sorveglianza, la comunicazione e la formazione tra i Paesi dell'area del Mediterraneo e dei Balcani per un maggior controllo delle malattie infettive e degli eventi epidemici trans-nazionali, con particolare riguardo a tre aree di interesse:

l'intelligenza epidemica trans-frontiera, giacché in un ambiente dove la circolazione dei beni e delle persone è in costante aumento, anche il rischio di epidemie è in crescita;

le malattie prevenibili da vaccino nelle popolazioni migranti e negli immigrati, poiché gruppi non adeguatamente vaccinati rappresentano un rischio potenziale per la trasmissione trans-frontiera ai paesi vicini;

l'epidemiologia delle zoonosi emergenti e ri-emergenti in quanto esse rappresentano una minaccia significativa alla sanità pubblica e la loro attuale tendenza in crescita è probabile che continui (influenza aviaria, BSE, brucellosi, rabbia ecc.).

Risultati attesi nel triennio

L'ISS coordinerà il progetto con il supporto di altri 5 *partner* del sud Europa (Bulgaria, Francia, Grecia, Italia-Regione Veneto, Spagna) e la collaborazione di diversi Paesi dei Balcani e del Mediterraneo. Nell'area di copertura del progetto, si prevede di:

creare una rete di istituzioni di sanità pubblica dei Paesi dell'Europa del Sud e dei Paesi extra-europei che affacciano sul Mediterraneo (Nord Africa, Balcani e Medio Oriente) per la raccolta di dati e la comunicazione rapida tra i Paesi

partecipare alla formazione di operatori di sanità pubblica in epidemiologia applicata e di campo

fornire dati e raccomandazioni sulla intelligenza epidemica trans-frontiera

fornire dati e raccomandazioni sulle malattie prevenibili da vaccino nelle popolazioni migranti e negli immigrati

fornire dati e raccomandazioni sulla epidemiologia delle zoonosi emergenti e ri-emergenti

diffondere le informazioni prodotte dal progetto ai singoli Stati e a coloro che devono esserne a conoscenza, attraverso un sito *web* e un bollettino elettronico.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto avrà profonde ricadute sia nell'area geografica di riferimento nel suo complesso, che nei singoli Stati partecipanti.

La rete delle istituzioni di sanità pubblica rafforzerà la solidarietà e la coesione tra i Paesi e permetterà di migliorare la sorveglianza delle malattie infettive e il controllo degli eventi epidemici e delle eventuali azioni di bioterrorismo, anche attraverso:

una piattaforma comune di intelligenza epidemica per la scoperta precoce di casi e la risposta rapida e trans-frontiera

una valutazione dell'accesso ai servizi di vaccinazione, dei focolai epidemici di malattie prevenibili da vaccino e dei programmi per migliorare la copertura vaccinale tra migranti e immigrati

una descrizione delle zoonosi emergenti e ri-emergenti nell'area e della loro diffusione

un gruppo di operatori di sanità pubblica nei diversi paesi formati nell'ambito del progetto

un sito *web* creato *ad hoc* per la divulgazione delle informazioni

Rischi in competizione: cause specifiche di mortalità e pattern di patologie/eventi in particolari gruppi di popolazione

Oltre ai dati di mortalità ufficiale, in cui viene codificata, secondo la Classificazione Internazionale delle Malattie (CIM), solo la causa iniziale di mortalità, l'Ufficio di Statistica, in base all'Accordo Quadro di Collaborazione Scientifica con l'ISTAT, dispone di dati originali esaustivi e completi relativi a tutte le condizioni patologiche o traumatiche che hanno contribuito al decesso di ciascuna persona e che "competono" tra loro per portare alla morte.

A partire dalla mortalità del 1995, l'ISTAT registra su supporto informatico tutto il contenuto del certificato di morte: oltre a quella che viene denominata "causa iniziale" (cioè quella patologia che ha dato inizio al corso degli eventi che hanno portato alla morte), sono state registrate anche le cause intermedie o complicanze, gli stati morbosi rilevanti e la causa finale.

L'analisi del quadro completo di eventi che hanno contribuito alla morte dà luogo a interessanti spunti di ricerca su particolari patologie, con codifica problematica, ovvero su particolari gruppi di popolazione; le linee di ricerca che in tale ambito vengono inizialmente proposte sono le seguenti:

1) Quadro epidemiologico del mesotelioma pleurico in Italia.

Tale patologia è letale e ha un'eziologia nota: l'esposizione (in ambiente di vita/lavoro) all'amianto. Poiché il mesotelioma pleurico non ha nella CIM una codifica specifica, ma ricade nella voce più generale di "Tumore Maligno della Pleura", l'analisi di tutte le patologie riportate sul certificato di morte fornisce un contributo essenziale per ricostruirne il quadro epidemiologico.

2) Mortalità tra i centenari. Nel nostro Paese è in corso una transizione demografica caratterizzata non solo dall'invecchiamento della popolazione, ma anche dall'ulteriore allungamento della vita delle persone già anziane. In questo ambito è di grande interesse lo studio delle persone che hanno superato il loro centesimo compleanno, per trarne indicazioni sui motivi di tale longevità.

Questa ricerca si propone di descrivere e caratterizzare rispetto al resto della popolazione il quadro patologico e l'esposizione ai rischi di morte dei centenari italiani; essa verrà condotta in collaborazione con il prestigioso gruppo di ricerca sulla longevità, guidato dal Prof. Franceschi dell'Università di Bologna.

3) Quadro patologico delle persone affette da "malattie rare". Poiché molte di queste malattie, ancorchè gravissime non sono di per sè letali, è interessante rintracciarle e studiarle tra le concause di morte.

Risultati attesi nel triennio

Dalle linee di ricerca sopra descritte, avvalendosi dei dati già disponibili (dal 1995 al 2002) e di quelli più aggiornati che verranno forniti nel prossimo triennio dall'ISTAT, si attendono i seguenti risultati:

1) Quadro epidemiologico del mesotelioma pleurico nel nostro Paese.

Valutazione della misura in cui il dato di mortalità per tumore maligno della pleura (CIM-9 163) può essere considerato una buona *proxy* della mortalità per mesotelioma pleurico; elaborazione di una stima dei casi di mesotelioma in Italia, ottenuta rintracciando tutti i decessi con diagnosi di mesotelioma (pleurico o in altre sedi) fra i decessi codificati con codici diversi da CIM IX 163. Poiché il mesotelioma pleurico è causato dall'esposizione all'amianto, verranno compiute analisi geografiche molto dettagliate per confermare o individuare *ex novo* aree di inquinamento; verranno inoltre studiati gli andamenti temporali della patologia.

2) Mortalità tra i centenari italiani.

Costruzione di un quadro dettagliato delle patologie che hanno costituito il processo che è culminato nell'evento morte nei centenari; studio delle differenze con la popolazione generale per suffragare ipotesi avanzate in studi clinici sulla longevità; analisi specifica delle differenze di genere (è noto che le donne sono molto più longeve degli uomini) e della distribuzione territoriale, per evidenziare eventuali caratterizzazioni legate a stili di vita o caratteristiche ambientali.

3) Analisi approfondita e articolata dei rischi in competizione tra le persone affette da malattie rare.

Trasferibilità dei risultati

Poiché il progetto riguarda argomenti di rilievo nell'ambito della Sanità Pubblica, si prevede una buona trasferibilità. In particolare:

Linea di Ricerca 1. Essendo l'obiettivo monitorare l'andamento del mesotelioma pleurico in Italia attraverso l'utilizzo dei dati di mortalità, con particolare riferimento allo studio dei *trend* temporali e della distribuzione geografica della patologia in esame, questo processo può portare sia a stimare l'impatto del mesotelioma sulla popolazione italiana, sia a identificare popolazioni ad alto rischio sulle quali concentrare le attività di risanamento ambientale e sorveglianza sanitaria.

Linea di Ricerca 2. Il contributo che verrà fornito all'avanzamento delle conoscenze in tema di invecchiamento della popolazione e di "grandi vecchi", oltre che essere interessante per la ricerca scientifica, potrà avere implicazioni in termini di azioni di Sanità Pubblica e più in generale, socio-sanitarie.

Linea di Ricerca 3. Anche in questo caso l'approfondimento su patologie gravi e che necessitano cure particolari fornisce utili indicazioni per la programmazione e l'organizzazione dei servizi sanitari e socio-sanitari.

Ruolo dei determinanti diagnostici e terapeutici sulla sopravvivenza dei pazienti oncologici in Italia. Progetto ITACARE-2/3

Raccogliere dati clinico-patologici da nove Registri tumori che collaborano con lo studio in forma standardizzata, secondo un protocollo stabilito, per casi diagnosticati nel periodo 1990-1994.

Interpretazione delle differenze di sopravvivenza per diverse aree italiane atte a fornire indicazioni utili a promuovere la diagnosi precoce e l'adozione di protocolli terapeutici ottimali.

Costituire un punto di riferimento all'inizio degli anni '90 con cui valutare le modificazioni indotte da azioni mirate a ridurre o eliminare sorgenti di disparità nell'accesso ai servizi sanitari.

Effettuate un *record-linkage* dei dati relativi ai pazienti diagnosticati dai RT italiani nel periodo 1990-1994 con dati del censimento della popolazione italiana del 1991.

Stima comparativa della sopravvivenza per tumore in Italia per variabili socio-economiche

Stima dell'incidenza dei tumori in Italia per variabili socio-economiche

Stima della prevalenza dei tumori nella popolazione in Italia per variabili socio-economiche

Risultati attesi nel triennio

Analisi comparativa della sopravvivenza per tumore in Italia per casi diagnosticati nel periodo 1990-1994 per modo di diagnosi, stadio e trattamento.

Analisi dell'incidenza e della mortalità per tumore per classe socio-economica

Trasferibilità dei risultati

Metodi di *record linkage* tra dati individuali di casi di tumore con *record* del censimento della popolazione Italiana

SETIL - Studio epidemiologico multicentrico italiano sull'eziologia dei tumori linfomopoiетici e dei neuroblastomi nel bambino: ruolo dell'esposizione ad inquinamento da traffico e a radiazione gamma (anche in associazione ai campi magnetici a 50 Hz)

Nel presente progetto, sono state coordinate due diverse linee di ricerca:

i) Valutazione dell'esposizione a benzene in un sottogruppo dei casi di leucemia e relativi controlli inclusi nello studio SETIL;

ii) Valutazione dell'esposizione a radiazione gamma in un sottogruppo dei casi di leucemia e relativi controlli inclusi nello studio SETIL.

Per quanto concerne la linea di ricerca Valutazione Esposizione a Benzene, è stato condotto uno studio multicentrico collaborativo con le Unità di ricerca SETIL di Torino, Milano, Firenze, Roma, Catania, Palermo, Cagliari. L'indagine ha incluso bambini con diagnosi di leucemia e bambini sani di controllo i cui genitori avevano acconsentito a rispondere a un'intervista sui possibili fattori di rischio per i tumori del sistema linfomopoiетico e a misure dirette dell'intensità del campo magnetico. Ai fini del presente progetto, sono state effettuate misure individuali ripetute di concentrazioni di benzene in zona respiratoria, di indicatori biologici urinari di esposizione e di concentrazioni di benzene *outdoor* (4 settimane di monitoraggio in un anno per ciascun bambino).

La raccolta dei dati è terminata in ritardo rispetto alle previsioni (2005 vs. 2003).

Nel triennio 2006-08 verranno realizzate analisi e pubblicazione dei risultati.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi dei dati sarà incentrata sui seguenti argomenti:

Valutazione della intensità e dei determinanti dell'esposizione a benzene in un campione di bambini italiani di età inferiore ai 12 anni.

Validazione delle risposte al questionario sull'intensità di traffico in prossimità dell'abitazione mediante misure dirette delle concentrazioni *outdoor* di benzene.

Valutazione dell'eventuale effetto di confondimento esercitato dall'esposizione a benzene sulla relazione tra incidenza di leucemia e esposizione a campi magnetici a 50 Hz.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno sottoposti per la pubblicazione su riviste scientifiche. Gli articoli pubblicati contribuiranno ad ampliare le conoscenze scientifiche nelle seguenti aree di specifico interesse per la sanità pubblica:

Livelli di esposizione ad inquinanti atmosferici tra i bambini italiani;

Entità e *pattern* dell'errore di misura nelle stime dell'esposizione a traffico basate su interviste;

Studio delle fonti di distorsione nei risultati degli studi epidemiologici sulla relazione tra esposizione a campi magnetici a 50 Hz e incidenza di leucemia infantile.

Sindrome metabolica e patologie correlate

La definizione di sindrome metabolica (SM), secondo NCEP-ATPIII, include la presenza di tre o più delle seguenti condizioni: obesità addominale, ipertrigliceridemia, basso livello di HDL, pressione arteriosa elevata, glicemia elevata. Lo stile di vita, in particolare la ridotta attività fisica e la dieta non bilanciata, così come l'azione di fattori genetici contribuiscono allo stabilirsi della SM. Questa comporta un aumentato rischio di malattie cardiovascolari (MCV), metaboliche (p.es. diabete di tipo II) ed epatiche (p.es. steatosi epatica non alcolica (SENA)). La relazione esistente tra sindrome metabolica e queste malattie è complessa con evidenze che suggeriscono una relazione tra le differenti combinazioni dei fattori di rischio e le suddette patologie. I dati in letteratura su questi aspetti non sono numerosi e una più approfondita conoscenza è auspicabile.

Gli obiettivi che si intendono conseguire con il progetto sono i seguenti:

Studio del ruolo di fattori dietetici e dell'attività fisica nello sviluppo della SM.

Studio del ruolo della SM nello sviluppo della SENA e correlazione tra SENA e segni subclinici di arteriosclerosi.

Stima del rischio di SM nei familiari di casi.

Costituzione di una banca di sieri e di DNA nucleare e mitocondriale dei soggetti partecipanti allo studio e di fratrie in cui almeno un individuo sia affetto da SM.

Studio del ruolo della SM nello sviluppo di MCV, in particolare delle malattie ischemiche del cuore, dell'*ictus* e dello scompenso cardiaco in uomini e donne di età media.

Studio del ruolo della SM nello sviluppo delle malattie legate all'invecchiamento con particolare riguardo alla *performance* fisica e a disturbi cognitivi in uomini e donne di età avanzata.

Risultati attesi nel triennio

I risultati derivanti dal primo filone d'indagine (studio Cittanova) permetteranno di stimare la prevalenza di SM e SENA, di valutare la loro associazione con lo stile di vita (in particolare con le abitudini alimentari), di verificare la copresenza di SENA e arteriosclerosi subclinica, e di stimare il rischio ricorrente di SM nella popolazione in studio. Ciò consentirà di mettere in opera interventi di prevenzione primaria mirati e un'attività di *counseling* per coloro che sono a rischio elevato di patologia. Inoltre, i risultati ottenuti costituiranno la base per uno studio successivo di *follow-up* mirante a definire insorgenza e evoluzione delle patologie in esame e il ruolo dei fattori di rischio nel loro decorso. La costituzione di una banca di sieri e di DNA consentirà, nell'ambito di progetti successivi, di testare ipotesi patogenetiche emergenti e di identificare geni associati alle patologie in esame, con ricadute in prevenzione e sanità pubblica e con la possibilità che tali attività possano portare all'identificazione di nuovi bersagli farmacologici. A tale scopo contribuirà anche l'analisi della banca biologica del Progetto Cuore. I dati del secondo filone di indagine consentiranno di stimare i rischi di sviluppo degli eventi cardio- e cerebrovascolari e del decadimento cognitivo e fisico nei soggetti affetti da SM con *follow-up* mediano di 10 anni.

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 SM nella popolazione e per un intervento mirato alla diminuzione del rischio di SENA, di MCV e di malattie legate all'invecchiamento

nei soggetti con SM. Le conoscenze acquisite favoriranno l'implementazione di interventi di prevenzione primaria e la messa in opera di azioni di *counseling* per i familiari a rischio elevato di patologia. La disponibilità di una banca biologica di sieri e di DNA consentirà di testare, successivamente, ipotesi patogenetiche emergenti e di identificare geni associati alla SM e alle patologie correlate. Tali attività potrebbero portare all'individuazione di nuovi bersagli farmacologici.

Sistema di sorveglianza di popolazione sui progressi delle aziende sanitarie in Italia (PASSI)

Sperimentare e identificare le condizioni per la messa a regime nelle regioni un sistema di sorveglianza e di monitoraggio di alcuni aspetti della salute della popolazione italiana di età compresa fra i 18 e i 69 anni in rapporto ad 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. Il ruolo del CNESPS è di mettere in funzione un sistema di sorveglianza, metodologicamente standardizzato, che permetta di confrontare i risultati ottenuti in diverse aree geografiche formando e assistendo i professionisti di salute delle regioni e delle Aziende Sanitarie Locali per la preparazione, la realizzazione della sorveglianza, l'analisi e la comunicazione dei dati e per la creazione delle condizioni che consentano localmente di aggiornare la programmazione delle attività sanitarie in relazione ai risultati della sorveglianza.

Risultati attesi nel triennio

Per il CCM del Ministero della Salute: mettere in atto e documentare i risultati di un sistema di sorveglianza di popolazione, contribuire a verificare i progressi del Piano Nazionale della Prevenzione 2005-2007, aderire al mandato dell'accordo stato regioni sulle linee guida dei dipartimenti di prevenzione e favorire il riorientamento dei dipartimenti verso i problemi di salute attuali.

Per le Regioni, le ASL e gli OER: disporre di un sistema di sorveglianza tempestivo, pertinente, semplice e adatto ai bisogni di informazione locale sugli aspetti prioritari di salute pubblica individuati come tali dalla popolazione e dai responsabili della strategia sanitaria nazionale e regionale e in particolare:

ogni anno stime sullo stato dei problemi che costituiscono i principali obiettivi di salute del sistema sanitario (fumo, attività fisica, alimentazione, ecc.), a livello di USL

ogni anno stime sulla penetrazione di alcuni interventi in sanità pubblica quali *screening* oncologici, misura della pressione, della glicemia ecc., a livello di USL.

Inoltre sarà possibile migliorare il *targetting* degli interventi e effettuare una re-distribuzione delle risorse in base a dati reali e locali, disporre di un *pool* di persone in grado effettuare la sorveglianza e quindi di identificare con migliore precisione e tempestività priorità di salute locali e condividere metodi e risultati della sorveglianza con altre ASL/Regioni all'interno di un *network* in vista dell'identificazione di *best practices*.

Trasferibilità dei risultati

La sperimentazione si svolgerà all'interno di Regioni e aziende sanitarie che metteranno a regime in un secondo tempo la sorveglianza di popolazione. Non sarà quindi necessario elaborare criteri di trasferibilità per la evidenza prodotta dal progetto. Sarà invece necessario costituire, alla fine del progetto, la *leadership* che sostenga il passaggio dalla fase sperimentale a quella di messa a regime della sorveglianza di popolazione.

Sopravvivenza per Tumori e Fattori Socio Economici nelle aree dei Registri Tumori Italiani (FASE)

Associare ai dati dei casi incidenti rilevati dai registri tumori (RT) italiani le informazioni socio economiche aggregate a livello della rispettiva sezione di censimento e di analizzare in relazioni a tali variabili i dati sulla sopravvivenza per tumore.

I RT partecipanti rileveranno l'indirizzo di residenza degli incidenti casi di tumore. Si applicherà una procedura per associare a ciascun indirizzo la relativa sezione di censimento. Si valuterà la percentuale di successo e la correttezza di tale associazione. Nell'ambito del *follow-up* dei pazienti, i registri che ancora non lo fanno raccoglieranno la causa di morte per i pazienti deceduti.

Un gruppo di studio definirà le variabili da analizzare tra le numerose informazioni rilevate al censimento. La scelta dovrà tener conto della validità delle informazioni, delle tecniche di rilevamento, delle precedenti esperienze nazionali e internazionali. Partendo dalle definizioni individuate al punto precedente, si estrarranno i valori medi e le deviazioni *standard* delle variabili identificate, a livello aggregato di sezione di censimento. Il risultato sarà un *file* con l'identificativo della sezione di censimento, seguito dai valori delle variabili socio economiche definite.

L'analisi della sopravvivenza sarà fatta aggiustando per cause di morte non tumorale (sopravvivenza relativa). A tale scopo si utilizzerà la sopravvivenza netta causa-specifica, avvalendosi delle informazioni sulla causa di morte per i pazienti deceduti.

Risultati attesi nel triennio

Includere l'osservazione e la valutazione delle variabili socio economiche all'interno del sistema di sorveglianza dei RT italiani.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno utili per valutare quantitativamente il grado di disparità nella distribuzione delle risorse e nell'accesso alle strutture sanitarie per il controllo delle malattie tumorali. Le informazioni saranno utili per la programmazione sanitaria.

Sopravvivenza per tumori in Europa (EUROCARE-4)

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 EUROCORE.

Indagine approfondita sulla variabili di stadio, sui determinanti dello stadio, e sulla terapia per un campione di casi. Raccolta dei relativi dati nelle aree dei registri tumori italiani, in corrispondenza con analoghe attività previste nelle altre aree europee.

Centralizzazione e analisi dei dati di sopravvivenza da registri USA e del Canada per valutare le differenze di sopravvivenza tra pazienti europei e nord americani.

Risultati attesi nel triennio

Analisi sistematica centralizzata della sopravvivenza in Europa. Confronti con le sopravvivenza dei pazienti nordamericani. Stima della prevalenza dei tumori nelle aree dei registri europei. Analisi statistica dei dati di sopravvivenza in relazione allo stadio e alla terapia.

Trasferibilità dei risultati

I risultati serviranno per valutare l'impatto delle politiche sanitarie e della ricerca di base nel miglioramento della prognosi dei pazienti oncologici a livello di popolazione

Sorveglianza dei tumori

Sviluppare e rendere disponibile per l'analisi la banca dati di mortalità dell'OMS

Analizzare i dati di sopravvivenza per tumore nelle aree italiane coperte da registri tumori, per valutarne e interpretarne le differenze geografiche in relazione ad analoghe stime ottenute negli altri Paesi europei

Stimare gli andamenti di incidenza e prevalenza a livello nazionale e regionale in Italia, e analizzarli comparativamente a quelli degli altri Paesi.

Produrre un rapporto annuale sulla situazione epidemiologica dei tumori in Italia.

Contribuire allo sviluppo e al mantenimento di un sito *web* per la diffusione dei dati essenziali agli operatori sanitari e al pubblico.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di stime di sopravvivenza in Italia, e analisi comparativa con gli altri Paesi europei. Stima e analisi sistematica dei *trend* di incidenza, prevalenza e mortalità dei principali tumori. Produzione del primo di una serie di rapporti sui tumori in Italia.

Trasferibilità dei risultati

Valutazione delle politiche sanitarie per il controllo delle malattie tumorali.

Regioni, sistema sanitario nazionale.

Sorveglianza della mortalità materna

Messa a punto, implementazione e valutazione di un modello prototipale di sorveglianza della mortalità materna in 6 Regioni campione del Nord, Centro e Sud Italia al fine di monitorare l'andamento nel tempo della mortalità materna e di rilevarne le principali cause associate.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di un modello di sorveglianza validato e applicabile sull'intero territorio nazionale, stima delle principali cause associate, stima della proporzione di morti evitabili e ipotesi di linee guida e protocolli per migliorare lo *standard* delle cure erogate.

Trasferibilità dei risultati

Il modello di sorveglianza validato potrà essere utilizzato nell'ambito del SSN.

Sorveglianza delle reazioni avverse da prodotti a base di piante officinali

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 Centro Nazionale di

Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità, dove vengono inserite in un *database* 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 di Farmacovigilanza per eventuali provvedimenti regolatori.

Risultati attesi nel triennio

Migliorare la conoscenza sulle reazioni avverse a prodotti a base di piante officinali.

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.

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.

Sorveglianza delle zoonosi in ambito veterinario e integrazione con le attività esistenti in ambito medico: ZONOSI MED-VET

La recente Direttiva CE 2003/99 sulla sorveglianza e il controllo delle zoonosi raccomanda di integrare le attività di sorveglianza degli agenti di zoonosi negli animali serbatoio al livello dell'allevamento, con la sorveglianza delle relative patologie nella popolazione umana. Le informazioni raccolte nei settori medico e veterinario dagli Stati Membri debbono essere inviate annualmente Autorità Centrali Europee (*European CDC* e *EFSA*) per essere analizzate e trasformate in informazioni per la prevenzione e il controllo delle zoonosi.

La Direttiva ha individuato quali argomenti prioritari per interventi di sanità pubblica:

La sorveglianza delle zoonosi a trasmissione alimentare;

La sorveglianza dell'antibioticoresistenza negli agenti zoonosici (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*) e nei microrganismi della flora intestinale degli animali (*E.coli*, *Enterococci*);

Lo studio epidemiologico ed eziologico dei focolai di tossinfezione alimentare.

Il Sistema di Sorveglianza delle zoonosi in Italia non è adeguato alla struttura di sistema integrato medico-veterinario. Questo progetto ha quindi l'obiettivo di integrare i sistemi di sorveglianza esistenti (notifica delle malattie infettive e sorveglianze speciali per l'ambito umano, piani di controllo e eradicazione di alcuni agenti infettivi e monitoraggio dell'antibioticoresistenza in ambito veterinario), in modo da razionalizzare e ottimizzare le attività di controllo e i flussi informativi relativi alle zoonosi.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale del Progetto è favorire l'integrazione delle attività di sorveglianza in ambito veterinario con le analoghe attività svolte in ambito medico, e adeguare il sistema italiano al sistema integrato che l'Unione Europea sta costruendo in materia di sorveglianza, *reporting*, allerta rapida e controllo delle zoonosi.

Il Reparto di epidemiologia delle malattie infettive del CNESP partecipa al progetto valutando i sistemi informativi e le modalità di intervento relative all'ambito medico delle zoonosi. Viene quindi svolto un ruolo chiave nella raccolta di dati sui casi di zoonosi nell'uomo.

I risultati attesi in questo ambito includono:

La descrizione di limiti e criticità dei sistemi di sorveglianza sulle zoonosi esistenti;

La definizione delle priorità di zoonosi per le quali non c'è ancora sorveglianza e proposte di azione.

Il coordinamento delle attività inerenti alle indagini di campo nei focolai epidemici e sviluppo di piani di intervento, con la predisposizione di piani integrati medico-veterinari per indagini di campo

La predisposizione di piani di allerta e risposta rapida medico-veterinari

Lo sviluppo di siti *web* di informazione e notifica nei settori medico e veterinario

Trasferibilità dei risultati

Grazie alla integrazione tra attività mediche e veterinarie, il progetto consentirà di ottenere risultati immediatamente trasferibili alla sanità pubblica, e in particolare:

La definizione delle malattie zoonosiche per cui sia prioritario avviare nuovi sistemi di sorveglianza, o modificare quelli attualmente in vigore.

Il miglioramento delle capacità diagnostiche degli agenti di zoonosi considerati prioritari

Il coordinamento dei flussi di informazione derivanti dalle reti europee a cui partecipano i diversi soggetti coinvolti nella rete

La diffusione delle informazioni a una rete definita di unità operative d'intervento.

La messa a punto di piani d'intervento regionali e nazionali per focolai epidemici

Lo sviluppo e potenziamento dei sistemi di notifica *on line*

Lo sviluppo di strumenti informativi tecnici e per l'opinione pubblica (siti *web*, bollettini e *report* sulla situazione delle zoonosi)

Sorveglianza di episodi, interventi e normative sull'etica nella ricerca clinica ed epidemiologica ai fini della formazione

Il Decreto ministeriale sulle Linee Guida di riferimento per l'istituzione e il funzionamento dei comitati etici (GU n. 122, 28/05/98) ha dato un forte impulso alla creazione di comitati etici locali e al decentramento delle responsabilità (anche legali) riguardo alla tutela dell'eticità e scientificità della ricerca sull'uomo. Questa rete ormai ampia di comitati etici pone il problema di costruire modalità di lavoro e una cultura condivisa. Anche un esperto del settore come Alessandro Liberati ritiene diffusa la sensazione che l'attività dei comitati etici si sia andata sviluppando in una sorta di "vuoto pneumatico" delle istituzioni per conto delle quali operano e auspica azioni centrate sulla creazione di un'infrastruttura di supporto.

Senza negare il ruolo decisivo dei comitati etici, resta comunque ai ricercatori chiarire ai garanti e agli specialisti di altri settori le specificità etiche e scientifiche dei propri studi e di giustificare i loro provvedimenti. Tale compito comporta per loro la necessità di acquisire il livello di sensibilità richiesto dalla società civile, idoneo a individuare i problemi etici rilevanti posti dalla loro ricerca.

A tale proposito nel triennio si proseguiranno attività di rilevazione e di descrizione anche tramite indagini empiriche delle questioni etiche connesse alla ricerca, in particolare quella epidemiologica, con l'obiettivo di sviluppare, da un lato, la cultura etica della ricerca tra i ricercatori e dall'altro, di fornire un supporto ai comitati etici relativamente ai problemi connessi alla fattibilità della ricerca.

Risultati attesi nel triennio

I risultati riguarderanno sintesi del dibattito etico nazionale e internazionale sulle ricerche a partecipazione umana, soprattutto ricerche cliniche e studi epidemiologici osservazionali. In particolare saranno descritte e valutate novità relative al consenso informato, ai comitati etici, alla sperimentazione clinica, alla protezione dei dati personali e alle normative riguardanti il settore.

Gli studi avranno solitamente forma di saggi o rassegne. Sono inoltre previste indagini a carattere empirico i cui dati saranno ottenuti dalla letteratura o mediante indagini. I dati saranno raccolti secondo modalità standardizzate tramite schede o questionari. Le analisi saranno prevalentemente di tipo frequentista. La precisione delle stime verrà valutata mediante il calcolo dei limiti di confidenza e le differenze di frequenza significative saranno stabilite mediante opportuni *test* statistici.

Trasferibilità dei risultati

Poiché l'obiettivo di questo progetto è contribuire a diffondere la cultura dell'etica della ricerca nel nostro Paese, favorendo il dibattito e lo scambio di opinioni tra le parti in causa riguardo a ricerca, comitati etici e normative, i risultati degli studi saranno pubblicati su riviste italiane del settore e saranno portati a convegni pertinenti.

I risultati delle ricerche verranno impiegati per la costituzione di un corso di etica della ricerca clinica ed epidemiologica con obiettivi formativi. Il CNESPS è uno dei principali motori dell'attività epidemiologica del Paese, è ben collegato col Ministero della Salute e società scientifiche nazionali per le necessarie collaborazioni, inoltre in esso sono presenti adeguate competenze per aspirare ad essere sede autorevole per tale attività.

Sorveglianza epidemiologica delle malattie prevenibili da vaccinazioni

Per mettere a punto le strategie di vaccinazione e valutarne l'efficacia sul campo è fondamentale disporre di informazione adeguate. La valutazione dell'impatto di programmi di vaccinazione è resa ancor più impellente dall'attuale quadro tecnico-istituzionale: a) i livelli essenziali di assistenza prevedono le vaccinazioni contro nove malattie (difterite, tetano, pertosse, poliomielite, epatite B, infezioni invasive da Hib, morbillo, rosolia e parotite); b) il Piano Nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita (PNEM) prevede l'attuazione fino al 2007 di azioni straordinarie di vaccinazione per i soggetti non adeguatamente vaccinati; c) la disponibilità sul mercato di nuovi vaccini contro meningococco C, pneumococco e varicella rende necessario uno stretto monitoraggio dei programmi vaccinali, sia a livello nazionale che nelle singole Regioni.

La sorveglianza delle malattie prevenibili con vaccino e il monitoraggio delle coperture vaccinali sono gli strumenti principali per il monitoraggio dei programmi 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. I sistemi di sorveglianza routinari presentano alcuni limiti in termini di tempestività, completezza e accuratezza; per questo sono stati messi a punto dei sistemi informativi dedicati che consentano di validare e integrare i dati già disponibili.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale di questo progetto è ottenere ulteriori dati epidemiologici che consentano di valutare le strategie vaccinali correnti, e programmare quelle future.

Si prevede pertanto di migliorare la sorveglianza epidemiologica delle malattie prevenibili con le vaccinazioni attualmente in commercio, e quantificare la quota di casi prevenibili, attraverso le seguenti attività:

mantenere nel tempo una rete di pediatri di famiglia, che su base volontaria aderiscano a un sistema di sorveglianza sentinella delle malattie prevenibili da vaccino in età pediatrica

stimare attraverso la rete 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

stimare nella medesima fascia di età la frequenza di complicanze in corso di pertosse, morbillo, rosolia, parotite epidemica e varicella

raccogliere dalle Regioni e Province autonome dati di copertura vaccinale per morbillo, rosolia e parotite nella fascia di età 1-14 anni

indagare con appropriate indagini di laboratorio i casi sospetti di morbillo, rosolia in gravidanza e rosolia congenita

descrivere l'epidemiologia delle meningiti batteriche e di altre malattie batteriche invasive, per agente eziologico, area geografica, fascia di età e stato vaccinale

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti saranno fondamentali per valutare il raggiungimento degli obiettivi previsti dal vigente Piano Sanitario Nazionale e dal Piano nazionale vaccini 2005-2007. La raccolta dei dati e la loro analisi e elaborazione saranno effettuate presso il RMI/CNESP; i risultati attesi sono elencati di seguito. I dati di incidenza e copertura vaccinale per malattia e fascia di età consentiranno di:

disporre di dati tempestivi e accurati sulla frequenza delle malattie prevenibili da vaccino, per età e area geografica

stimare la frequenza delle loro complicanze

identificare eventuali eventi epidemici

valutare l'efficacia sul campo delle vaccinazioni

identificare gruppi di popolazione vaccinati in modo inadeguato

valutare eventuali fattori di rischio per la mancata vaccinazione

facilitare lo scambio di informazioni e il ritorno di dati attraverso i siti *web*

Sorveglianze speciali di malattie infettive

Il monitoraggio della frequenza delle malattie infettive in Italia è affidato al sistema di notifica obbligatoria (DM del 15/12/1990 e successive modifiche). Tale sistema assolve ai compiti di registrazione dei casi delle più comuni malattie infettive, ma i dati sono spesso incompleti, poco tempestivi e spesso insufficienti a descrivere e caratterizzare l'epidemiologia di infezioni per le quali devono essere adottati interventi di controllo particolari. Nel corso degli anni passati sono quindi stati istituiti una serie di sistemi di sorveglianza speciali dedicati, mirati a diverse infezioni, ciascuno caratterizzato da specifiche esigenze di sanità pubblica e diverse tipologie di dati richiesti che hanno consentito di validare e integrare i dati già disponibili.

Tra i sistemi attualmente attivi sono il sistema di sorveglianza delle salmonellosi e delle infezioni da VTEC, la sorveglianza delle legionellosi (e dei relativi interventi ambientali) e degli agenti batterici portatori di antibiotico resistenza.

Ognuna delle sorveglianze citate risponde a un preciso adempimento formale di sanità pubblica nazionale e internazionale, per cui i dati raccolti in Italia vengono inviati a reti di sorveglianza di livello europeo (UE o OMS).

La molteplicità delle iniziative avviate in tempi diversi e con diverse finalità ha creato un mosaico di attività che ora sono state inserite in una stessa infrastruttura concettuale e tecnologica.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo generale:

Integrare i dati del sistema routinario con informazioni più dettagliate riguardo la frequenza, l'andamento clinico e i fattori di rischio associati alle seguenti patologie: legionellosi, infezioni enteriche, antibiotico resistenza.

Obiettivi specifici:

Monitorare la frequenza di legionellosi diagnosticata in Italia, sia dal punto epidemiologico che clinico-nosologico, con particolare attenzione ai fattori di rischio per l'acquisizione della malattia. In particolare stimare il numero e la distribuzione proporzionale dei casi di legionellosi comunitaria, associata ai viaggi, e nosocomiale.

Descrivere l'epidemiologia delle infezioni enteriche da salmonella, da *E.coli* produttori di Vero-citotossina (VTEC) e da altri batteri enteropatogeni in Italia. In particolare descrivere il numero di casi di Salmonella segnalati annualmente a livello nazionale, la distribuzione proporzionale dei ceppi di Salmonella per sierotipo e la proporzione di casi di Salmonella in cui è stata testata l'antibiotico resistenza per i più comuni agenti antimicrobici e indagati dal punto di vista epidemiologico

Descrivere l'andamento dell'antibiotico resistenza in Italia. In particolare descrivere il numero di isolati da sangue e *liquor* per semestre, patogeno e laboratorio e la proporzione di ceppi resistenti e multiresistenti secondo profili definiti.

Trasferibilità dei risultati

Questi sistemi sono già stati avviati a livello nazionale e hanno fornito stime di incidenza e prevalenza utilizzate per intraprendere azioni di prevenzione e controllo.

Con il presente progetto, le attività esistenti verranno quindi consolidate e integrate, in modo da ottenere ulteriori dati epidemiologici che consentano di valutare il "burden of diseases" della legionellosi, delle infezioni enteriche da salmonella e da *E.coli* produttori di Vero-citotossina (VTEC) e dell'antibiotico resistenza. I risultati ottenuti saranno utilizzabili per valutare l'impatto di sanità pubblica delle azioni di controllo intraprese nei confronti di queste patologie.

Sperimentazione clinica controllata e randomizzata sull'uso dietetico di integratori per la prevenzione della cataratta senile. Studio in collaborazione con l'Università di Parma e i National Institutes of Health degli USA. (Collaborative italian-american clinical trial of nutritional supplements and age-related cataract (CTNS))

La cataratta senile è una malattia dovuta alla progressiva opacizzazione del cristallino che limita la funzione visiva fino alla cecità. È estremamente comune nelle persone anziane (28% a 65-74 anni). L'unica terapia disponibile è la sostituzione chirurgica del cristallino opacizzato. Per tale intervento in Italia, nel 2003, si contano oltre 237.000 schede di dimissione ospedaliera.

Anche se la *World Bank* ha collocato quella per cataratta tra le chirurgie più efficaci rispetto al costo, resta il problema della sua praticabilità nelle nazioni povere e dell'ammontare dei costi in quelle ricche. Costi così elevati da far ritenere, a prescindere da altri vantaggi, desiderabile l'introduzione di una strategia preventiva.

Più di venti anni fa sono cominciati studi epidemiologici, osservazionali, alcuni dei quali con l'impegno di questo Istituto, per scoprire le cause prevenibili della cataratta.

Un gruppo di nutrienti particolarmente studiato è rappresentato dagli antiossidanti assunti con il cibo o sotto forma di integratori dietetici. Nonostante i risultati incoraggianti degli studi osservazionali era necessaria una conferma definitiva attraverso una sperimentazione clinica di elevato livello qualitativo.

Il CTNS, avviato nel 1995, terminerà nel 2008. Il suo scopo consiste nel valutare la tollerabilità e l'efficacia nel rallentare l'insorgenza o la progressione della cataratta di un integratore multivitaminico e minerale a dosaggi simili a quelli consigliati nella dieta

Risultati attesi nel triennio

Il CTNS è suddiviso in tre fasi: la prima, nel 1995, è stata dedicata alla preparazione dello studio (manuale delle procedure, ecc.); la seconda dal 1995 al 2007 riguarda la raccolta dati: dal reclutamento e lungo visite successive dei soggetti partecipanti; la terza sarà impiegata alla verifica dei dati, alla loro analisi e alla preparazione del rapporto finale.

Lo studio riguarda 1020 soggetti con età tra 55 e 75 anni, che al momento del reclutamento avevano una cataratta iniziale o nessuna cataratta. Mediante sorteggio, circa la metà dei soggetti sono stati assegnati a prendere su base giornaliera un integratore dietetico e l'altra metà un *placebo* non riconoscibile (studio a doppia mascheratura).

La raccolta dati all'inizio dello studio ha riguardato la classificazione del cristallino, caratteristiche demografiche, e i livelli di alcuni nutrienti nel sangue. Mediante visite a cadenza semestrale si stanno raccogliendo dati su eventi avversi, ospedalizzazioni e mortalità; è inoltre valutata l'aderenza dei soggetti al trattamento e lo stato del cristallino. Per tutti gli esami strumentali e di laboratorio sono eseguiti controlli di qualità.

Ogni anno, due rapporti consuntivi sulle attività di ricerca sono sottoposti a una commissione esterna (*Data and safety monitoring committee*) che decide sulla idoneità della sperimentazione a proseguire.

Connessi al CTNS sono stati finora pubblicati i risultati di sette studi ancillari.

Trasferibilità dei risultati

Qualora si rilevasse un effetto protettivo degli integratori della dieta, è presumibile, vista la semplicità e notorietà del trattamento, che sarà prontamente accettata l'indicazione per la prevenzione della cataratta degli individui maggiormente a rischio.

In termini di sanità pubblica un calcolo del *National Eye Institute* (USA) fa ritenere che un ritardo nell'insorgenza di cataratta di dieci anni porterebbe ad una riduzione del 50% della sua prevalenza nella popolazione.

Qualora non si rivelasse un effetto protettivo, la qualità di questo studio è sufficientemente elevata per confutare tutti gli studi osservazionali che hanno trovato associazioni protettive in popolazioni, come quella italiana, senza carenze nutrizionali.

Sperimentazione dello strumento di raccolta dati e del flusso informativo per la registrazione degli interventi di protesi di anca e la valutazione dell'esito a breve termine (linea di ricerca nel progetto europeo EUPHORIC)

La valutazione dell'esito di interventi di sostituzione protesica è materia complessa, come dimostrato da studi condotti in ISS (EIPA e QUAANCA), 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 10 anni: risulta quindi indispensabile mettere a punto metodiche che permettano di valutare l'esito a breve considerando altri fattori. Vi è evidenza che la variabile di esito più sintetica e significativa in questo ambito sia la misura della qualità della vita. Lo studio si propone di sperimentare in uno studio multicentrico poliregionale insieme a Regioni e Società scientifiche: 1) una scheda di raccolta dati, elaborata in base a una revisione sistematica della letteratura (fattori di rischio e comorbidità), usata poi nel Registro nazionale; 2) il nuovo flusso informativo dato dall'abbinamento di scheda e SDO; 3) la valutazione dell'esito tramite somministrazione di questionari già validati per la misura della qualità della vita come avviene già in altri paesi del mondo in cui è attivo da anni un Registro nazionale degli interventi (Svezia, Nuova Zelanda)

Risultati attesi nel triennio

Validazione della scheda di raccolta dati. Validazione del flusso informativo basato sull'utilizzo delle SDO integrate da alcune informazioni aggiuntive relative al dispositivo (etichette) e al paziente (lato operato), metodologia che verrà poi utilizzata a livello nazionale per la raccolta dati del Registro. 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. Elaborazione di procedure di *risk adjustment*. Calcolo di alcuni indicatori individuati all'interno del progetto.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità è immediata: i risultati conseguiti nello studio multicentrico poliregionale per la sperimentazione della scheda, del flusso informativo e della metodologia per la valutazione dell'esito nel breve-medio termine, verranno utilizzati per l'attivazione del registro nazionale degli interventi di protesi di anca.

Sperimentazione di un sistema informativo sul circuito termale italiano

La Fondazione per la Ricerca Scientifica Termale ritiene interesse strategico per l'intero settore termale avere una conoscenza, basata su dati raccolti ed elaborati con metodo statistico-epidemiologico e con adeguati strumenti informativi e informatici, circa le principali caratteristiche socio-demografiche e di salute delle persone che si rivolgono, per trattamenti, al Sistema Termale Nazionale.

Tale interesse è condiviso anche dalla Federterme - organizzazione rappresentativa delle industrie termali italiane e socio fondatore della Fondazione.

Avere informazioni sul Circuito Termale, a cui si rivolgono ogni anno moltissime persone provenienti dalla "popolazione generale", raccolte e analizzate con metodo scientifico epidemiologico costituisce un tema interessante in ambito di ricerca in Sanità Pubblica.

In questo ambito è stata avviata nel 2005 una collaborazione tra la Fondazione per la Ricerca Scientifica Termale e l'Istituto Superiore di Sanità (Ufficio di Statistica) per condurre un Progetto Scientifico che si propone di effettuare l'analisi descrittiva del sistema termale italiano, di sperimentare una scheda per la raccolta di informazioni, attinenti alle prestazioni termali e al profilo di salute delle persone che effettuano trattamenti termali in regime di Convenzione e di sperimentare un modello di sistema informativo su tali dati, che si avvalga delle più adatte metodologie di *Information Technology*, compresa la realizzazione di un sito *web*.

Risultati attesi nel triennio

La Fase Pilota di questo progetto ha previsto l'arruolamento di 17 Stabilimenti Termali che su base volontaria hanno acconsentito alla somministrazione di un questionario *ad hoc* predisposto dall'Ufficio di Statistica.

Tale rilevazione è avvenuta durante due settimane: dal 12 al 17 settembre e dal 10 al 15 ottobre del 2005. Esaurita la fase di rilevazione delle informazioni su supporto cartaceo, è stata attivata la predisposizione di una banca dati informatizzata, che verrà alimentata con la più appropriata metodologia di IT (*Information Technology*): immissione guidata e controllata su apposito sito *web*.

Questo aspetto è curato dal *partner* informatico del Progetto, il Cineca di Bologna, Consorzio Interuniversitario per il Calcolo, organismo prestigioso e dotato di grandissima qualificazione ed esperienza.

Quando nel 2006 il sistema informatizzato sarà disponibile, ciascuno Stabilimento Termale si occuperà dell'immissione dei suoi dati; per mettere tutti gli stabilimenti in condizione di usare il sistema (che sarà sofisticato tecnicamente ma *user-friendly* per chi deve avvalersene) l'Ufficio di Statistica e FederTerme organizzeranno, analogamente a quanto è stato fatto all'avvio della

fase di rilevazione, una breve riunione per la formazione degli operatori che materialmente accederanno al sistema stesso.

Per fornire a ciascuno stabilimento un *feed-back* dell'attività svolta nell'ambito del Progetto, il sistema produrrà in automatico un riepilogo dei dati immessi.

Successivamente verranno analizzate le informazioni organizzate nella base di dati, sia allo scopo di descrivere tutte le caratteristiche rilevate, sia per trarne spunti per eventuali modifiche e affinamenti sia del questionario (la "scheda") che del sistema.

Le suddette analisi, nonché una attenta valutazione di quanto segnalato da parte degli operatori sul campo costituirà il risultato della Fase Pilota del Progetto.

Sulla base di questi risultati si valuterà come estendere nel tempo e nello spazio il Sistema.

Trasferibilità dei risultati

In un'ottica di sanità pubblica vi è l'esigenza di un approfondimento delle conoscenze in un campo non ancora esplorato, utile sia per descrivere con metodo scientifico adeguato un aspetto numericamente rilevante di prestazioni del Servizio Sanitario che per raccogliere informazioni sul profilo di salute delle persone che si rivolgono al circuito termale.

Sperimentazione e valutazione sul campo di modelli operativi di corsi di accompagnamento alla nascita e incontri in puerperio

Mediante la realizzazione di un corso verrà messa a punto con operatori di ASL che aderiscono al progetto e in particolare nelle ASL che hanno chiesto la consulenza per l'implementazione del Progetto Obiettivo Materno Infantile, la progettazione operativa del corso di accompagnamento alla nascita, che i partecipanti con la supervisione dell'ISS realizzeranno e valideranno con un metodo e gli strumenti messi a punto nel corso.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione della soddisfazione delle partecipanti al corso di accompagnamento alla nascita e dell'esposizione alle procedure raccomandate nel percorso nascita.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto e sperimentazione di un progetto prototipale metterà a disposizione corsi di accompagnamento, da parte del SSN, alla nascita.

Sperimentazione sul campo e valutazione di modelli prototipali di corsi di educazione sessuale nelle scuole e creazione di spazi adolescenti

Mediante la realizzazione di un corso verrà messa a punto con operatori di ASL che aderiscono al progetto e in particolare nelle ASL che hanno chiesto la consulenza per l'implementazione del Progetto Obiettivo Materno Infantile, la progettazione operativa del corso di educazione sessuale nelle scuole e di creazione di spazi adolescenti, che i partecipanti con la supervisione dell'ISS realizzeranno e valideranno con un metodo e gli strumenti messi a punto nel corso.

Risultati attesi nel triennio

Validazione del modello prototipale mediante sistemi e indicatori di valutazione della modificazione delle conoscenze, delle attitudini e dei comportamenti riguardo la salute sessuale degli/le adolescenti.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto e sperimentazione di un progetto prototipale metterà a disposizione modelli operativi di intervento, da parte del SSN, nella promozione della salute riproduttiva tra gli adolescenti.

Strategie vaccinali e modelli matematici

L'efficacia dei vaccini nella prevenzione delle più importanti malattie infettive è unanimemente riconosciuta come uno dei più grandi successi in medicina. Grazie ai programmi di immunizzazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e dei suoi *partner*, il vaiolo è stato eradicato e la poliomielite dovrebbe essere eliminata dalla faccia del pianeta in un prossimo futuro. Grazie alla disponibilità di moderne e sofisticate tecnologie di ingegneria genetica, è possibile accelerare lo sviluppo di nuovi vaccini sicuri e efficaci. Per esempio, un nuovo, efficace vaccino coniugato per la meningite C è stato prodotto e introdotto in Inghilterra per programmi d'immunizzazione dell'infanzia alla fine del 1999. Quando un nuovo vaccino è disponibile per l'uso, i decisori degli interventi di Sanità Pubblica devono scegliere la miglior strategia per usarlo. In questa prospettiva i modelli matematici consentono di stimare l'impatto di programmi vaccinali sulle malattie prevenibili.

Questo progetto di ricerca si prefigge di mettere a punto dei modelli matematici per valutare eventuali strategie di vaccinazione con prodotti recentemente introdotti in commercio (vaccini coniugato per il meningococco C e per la varicella) o limitati ad alcune categorie di popolazione (influenza). Il reparto malattie infettive del CNESPS collaborerà alla componente del progetto che riguarda la prevenzione delle meningiti e altre infezioni invasive da meningococco C, in collaborazione con le Università di Genova e di Pisa.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto prevede la raccolta dei dati epidemiologici delle infezioni invasive da meningococco in Italia e la loro analisi. Inoltre, un campione di bambini sotto i 3 anni sarà seguito nel tempo, allo scopo di acquisire informazioni sulla forza di infezione (FOI) attraverso l'isolamento del meningococco dal nasofaringe.

I principali risultati che potranno derivare dallo studio sono i seguenti:

Combinazione dei dati disponibili al fine di stimare la forza di infezione per età della *Neisseria Meningitidis* in Italia, con riferimento ai 4 gruppi d'età più importanti per l'infezione meningococcica, vale a dire bambini < 2 anni, bambini > 2 anni, adolescenti e giovani adulti.

Disegno, a partire dalla forza di infezione stimata, del profilo epidemiologico naturale (ossia in assenza di vaccinazione) della Meningite da meningococco C in Italia.

Sviluppo del modello matematico (compartimentale, deterministico, strutturato per età) incorporante le stime della forza di infezione e delle matrici di contatto individuate nelle fasi preceenti e suo confronto con i dati disponibili.

Utilizzazione del modello al fine di produrre scenari epidemiologici utili a valutare la bontà relativa delle possibili strategie di intervento vaccinali con particolare enfasi sul punto di vista della prospettiva costo-efficacia.

Trasferibilità dei risultati

Non ci sono molti studi di modellistica matematica applicati a definire la miglior strategia di vaccinazione con il vaccino coniugato per il meningococco C. Pertanto, tenuto anche conto della complessità dell'epidemiologia della meningite, e dell'alto grado di incertezza di molte variabili critiche, ulteriori conoscenze sono necessarie per la scelta della migliore strategia di vaccinazione. I risultati di questo progetto, quindi, consentiranno di migliorare le conoscenze a riguardo, e in particolare:

definire meglio la forza di infezione da meningococco nei soggetti di età inferiore a 3 anni attraverso uno studio prospettico

scegliere il miglior modello matematico per confrontare le differenti strategie di vaccinazione con il vaccino coniugato adottate da differenti nazioni nel mondo;

valutare le *performance* del modello matematico scelto con l'analisi di sensibilità (per esempio facendo variare l'efficacia della vaccinazione, la durata della protezione, ecc.).

Studi controllati sulla depressione

Verranno o portati a termine o iniziati tre tipi di studi sull'efficacia dei trattamenti psicoterapeutici di tipo cognitivo-comportamentale basati su manuali per i pazienti, applicati sotto la guida di professionisti:

Studio controllato di tipo *cluster* su familiari di pazienti psichiatrici gravi. In questo caso verrà indagato anche l'effetto del trattamento nel diminuire il carico familiare e migliorare la capacità di *coping* dei familiari.

Studio controllato di tipo *cluster* dell'aggiunta del manuale a gruppi di mutuoaiuto sulla depressione. In questo caso l'applicazione del manuale sarà promossa dagli stessi conduttori dei gruppi, appositamente formati.

Studi di fattibilità e di prima verifica dell'efficacia del trattamento sulla depressione *post-partum* secondo il modello di Milgrom e Martin.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dell'efficacia e costo-efficacia, in un disturbo così diffuso e così invalidante, di un tipo di trattamento facilmente replicabile che assicura piena trasparenza nel metodo e notevole uniformità di applicazione.

Per quanto riguarda il trattamento della depressione post-natale si prevede anche di mettere a punto una strategia di *screening* delle donne a rischio e un modello di collaborazione tra servizi ostetrico-ginecologici e pediatrici da una parte e servizi di salute mentale dall'altra.

Per quanto riguarda i gruppi di mutuoaiuto si fa presente che dalla combinazione dei punti di forza dei gruppi di mutuo aiuto con quelli del trattamento strutturato potrebbe originare una modalità di intervento di grande originalità e potenzialità.

Trasferibilità dei risultati

Da quanto detto sopra è chiaro che i risultati sarebbero facilmente trasferibili, perché la presenza di manuali per i pazienti favorisce enormemente la formazione degli operatori e la replicazione dell'intervento.

Studi sullo stato di salute della popolazione

Per descrivere lo stato di salute di una popolazione si possono seguire approcci diversi, riconducibili a due categorie principali: avvalersi di dati correnti, raccolti in modo esaustivo su tutta la popolazione oppure condurre indagini campionarie *ad hoc*, che a loro volta possono riguardare la salute percepita (Indagini di tipo HIS-*Health Interview Survey*) o la misurazione oggettiva di caratteristiche personali e parametri biomedici (Indagini di tipo HES-*Health Examination Survey*).

Questo progetto si articola in due linee di ricerca, che seguono i due approcci suddetti:

1) Analisi delle schede di dimissione ospedaliera.

Nell'ambito di un Accordo con il Ministero della Salute, l'Ufficio di Statistica dell'ISS può disporre di dati individuali (ancorché anonimi e nel pieno rispetto della normativa sulla *privacy*) sulle persone ricoverate nel nostro Paese. Attualmente sono disponibili i dati relativi agli anni 2000-2002; nel corso del triennio, in base all'accordo, il Ministero fornirà i dati più aggiornati. Ci si propone di analizzare i ricoveri per le varie condizioni patologiche, ma anche il percorso nel tempo dei soggetti che vengono ricoverati, e questo è un punto innovativo rispetto alle analisi sui ricoveri ospedalieri condotte fino ad ora.

2) Indagini sullo Stato di Salute di una Popolazione (*Health Survey*)

2.1) Progetto Europeo "FEHES - *Feasibility of a European Health Examination Survey*". Il Progetto si propone di valutare la fattibilità di una indagine europea del tipo HES, cioè basata su misurazioni oggettive di caratteristiche personali, stili di vita e parametri biomedici, prendendone in considerazione i vari aspetti teorici e pratici. L'Ufficio di Statistica dell'ISS è

l'unica Unità Operativa italiana di un Progetto che vede qualificate presenze di omologhi in vari Paesi dell'Istituto di Sanità.

2.2) Progetto Europeo “*EU Health Surveys Information Data Base Project*”. Ci si propone di aggiornare e completare la Base di Dati che raccoglie le caratteristiche di tutte le indagini di tipo HES e HIS che si svolgono in Europa.

Risultati attesi nel triennio

I risultati che ci si propone di ottenere si possono così sintetizzare;

1) Analisi delle schede di dimissione Ospedaliera. Poiché si tratta di archivi di dati assai ampi (mediamente ogni anno si contano circa 12 milioni di ricoveri) è necessario, avvalendosi di un qualificato *partner* tecnico (da pagare con fondi in fase di reperimento), costruire una base di dati facilmente interrogabile che consenta di effettuare analisi articolate su molteplici parametri, tra i quali: genere ed età delle persone ricoverate, tipo e luogo di ricovero, durata, causa del ricovero e altre patologie presenti. Le analisi riguarderanno patologie e condizioni di interesse in Sanità Pubblica tra le quali sono per ora previsti il Mesotelioma Pleurico e le Patologie Rare (in collaborazione con il Registro Nazionale situato in Istituto e coordinato dalla Dr.ssa Taruscio).

2.1) Si prevedono specifici risultati per ciascuno dei *Working Party* in cui è articolato il Progetto: procedure di campionamento e reclutamento, analisi della fattibilità tecnica di una HES, strumenti e protocolli di misura, standardizzazione, controllo di qualità, *training* degli operatori, problemi legati alla *privacy*, disseminazione dei risultati, valutazione complessiva dello Studio di Fattibilità.

2.1) Per elaborare la nuova base di dati sulle *Survey*, si dovrà studiare quali aree attinenti alla salute ricomprendere, come codificarle, quali *survey* e di che tipo siano da prendere in esame. Si dovranno poi stabilire dei criteri per definire “raccomandabili” a livello europeo alcune impostazioni di *Survey*.

Trasferibilità dei risultati

1) Per quanto riguarda le Schede di Dimissione Ospedaliera, l'analisi su specifiche patologie di impatto in Sanità Pubblica, come il mesotelioma e le malattie rare potrà avere ricadute importanti in termini di stima dei bisogni sanitari e socio-assistenziali nel territorio.

2) Le conclusioni che scaturiranno dai Progetti Europei sulle *Survey* di Stato di Salute potranno fornire utili indicazioni per colmare il debito informativo del nostro Paese e decidere (finalmente) di attuare una HES a livello italiano.

Studio ANTARES: uno studio *post-marketing* sui trattamenti farmacologici per l'artrite reumatoide

ANTARES è uno studio prospettico multicentrico sui pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con i farmaci biologici anti-TNF alfa. Lo studio è finalizzato ad approfondire la conoscenza disponibile sul beneficio e sul rischio di questi farmaci nelle condizioni di utilizzo della pratica clinica corrente (studio di *post-marketing surveillance*).

ANTARES è stato avviato nel momento in cui i farmaci indicati per l'artrite reumatoide sono stati registrati in Italia ed è stata decisa la loro rimborsabilità a carico del Servizio Sanitario.

Le informazioni sulla evoluzione della patologia nei pazienti trattati, raccolte da circa 150 centri clinici di riferimento distribuiti sull'intero territorio nazionale, confluiscono in un *database* centrale attraverso un collegamento internet disponibile solo per i centri accreditati.

Risultati attesi nel triennio

Definire le caratteristiche della popolazione trattata con farmaci biologici anti-TNF alfa per l'artrite reumatoide.

Migliorare la conoscenza del profilo di beneficio/rischio delle varie categorie di farmaci in studio nelle condizioni della normale pratica clinica.

Fornire alle autorità regolatorie gli elementi necessari per la definizione dei regimi di concedibilità.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazione di *report* periodici sull'andamento dello studio

Organizzazione di seminari di aggiornamento

Relazioni a convegni e pubblicazioni scientifiche.

Studio collaborativo ISS-SIEP (Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica) sui gemelli con diabete di tipo 1 in età pediatrica

L'obiettivo è uno studio, su base di popolazione, della concordanza nei gemelli del diabete di tipo 1 (T1DM) insorto in età pediatrica. Obiettivi specifici sono:

il confronto delle concordanze per zigosità e genere (MZ e DZ stesso sesso e sesso opposto);

il tempo di discordanza di malattia tra il gemello probando e il suo cogemello;

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 dagli oltre 60 servizi di diabetologia pediatrica distribuiti su tutto il territorio nazionale e aderenti alla Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica (SIEP). I gemelli fra i casi saranno identificati dal Reparto di Epidemiologia Genetica attraverso un *record-linkage* dei casi di T1DM con il Registro Nazionale Gemelli. I pediatri di riferimento eseguiranno la verifica della condizione di gemello, la validazione della diagnosi di T1DM nel probando, la raccolta dei dati clinico e anamnestici, e l'esame clinico del cogemello. 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 6500 pazienti è ipotizzabile l'identificazione di almeno 60-70 coppie di gemelli (1% circa della popolazione). Il totale di gemelli con diabete di tipo 1 sul numero delle coppie dipenderà dalla concordanza di malattia che è una delle misure che si vuole stimare in questo studio. Circa 1/3 delle coppie dovrebbe essere MZ. Il rapporto maschi/femmine dovrebbe essere circa 1:1 o leggermente superiore all'unità in accordo con la leggera maggiore incidenza della malattia nel sesso maschile.

Trasferibilità dei risultati

La ricaduta immediata dello studio attiene all'ambito clinico: le stime emerse saranno utili al diabetologo per la consulenza sul rischio di ricorrenza della malattia in ambito gemellare e familiare.

Studio DAI: Complicanze macroangiopatiche nei pazienti diabetici di tipo 2 afferenti ai servizi di diabetologia italiani

Lo studio DAI, nato dalla collaborazione tra Diainf (gruppo di studio Diabete e Informatica), Associazione Medici Diabetologi e Istituto Superiore di Sanità (9) è uno studio multicentrico di coorte che si è posto come obiettivo principale lo studio delle complicanze macroangiopatiche 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 della variabilità delle abitudini terapeutiche e delle prestazioni offerte dai servizi; valutazione dei modelli terapeutici utilizzati per il controllo della glicemia

Lo studio è condotto su un campione casuale rappresentativo dei pazienti visitati presso i 201 servizi partecipanti nel periodo settembre–giugno 1999. La coorte in studio, costituita da 19.570 pazienti, è seguita con *follow-up* annuali.

Risultati attesi nel triennio

Descrizione della popolazione italiana di diabetici di tipo 2, afferenti ai servizi di diabetologia, in base alle principali caratteristiche demografiche e cliniche e ai fattori di rischio cardiovascolare.

Definizione di un atlante italiano della patologia diabetica

Stima della prevalenza e incidenza delle macroangiopatie nei diabetici italiani

Analisi dei fattori di rischio associati all'incidenza delle complicanze macroangiopatiche

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.

Pubblicazione di un atlante italiano della patologia diabetica.

Relazioni a convegni e pubblicazioni scientifiche.

Studio di Coorte dei Neonati Italiani (CNI)

La conoscenza del modello eziologico di molte malattie dell'infanzia e dell'età evolutiva richiede un approfondimento circa l'interazione tra la componente genetica e quella ambientale. Il grande interesse nei riguardi di questi argomenti è testimoniato dal fatto che in varie parti del mondo si stanno arruolando coorti di nati, con conservazione di materiale biologico, per una valutazione prospettica degli esiti. Nell'ambito dei programmi speciali *ex art* 12 del Ministero della Salute del 2001 e del 2003 sono stati condotti due studi pilota per l'arruolamento di due coorti rispettivamente a Roma e a Bologna. Sulla base di queste esperienze si è costituito un gruppo di coordinamento nazionale per la promozione di uno studio multicentrico italiano. Lo scopo generale del progetto è la creazione della infrastruttura per uno studio nazionale di nuovi nati i cui obiettivi sono:

costruire un *network* nazionale per la conduzione di uno studio di coorte

predisporre le metodologie per l'arruolamento, la conservazione del materiale biologico,

l'accertamento delle esposizioni e il *follow-up*

arruolare circa 10.000 neonati in diversi centri nascita italiani

creare una banca biologica centralizzata

organizzare il *follow-up* sui principali problemi di salute dell'infanzia

Lo studio è coordinato dalla Regione Lazio. Il reparto di Epidemiologia Genetica del CNESPS è impegnato specificamente negli obiettivi 1,2 e 4.

Risultati attesi nel triennio

Le informazioni raccolte attraverso uno studio prospettico su un ampio numero di neonati in Italia permetteranno di:

stimare l'occorrenza delle principali patologie e problemi che insorgono nei primi anni di vita e valutare eterogeneità geografiche, temporali e per gruppi di popolazione;

testare ipotesi etiologiche di fattori genetici, socio-economici, ambientali, e di stili di vita sull'insorgenza di malattia o di condizioni predisponenti la malattia, e sulle loro interazioni;

disporre di dati riferimento per valutare il ruolo di possibili future modifiche dello stile di vita;

valutare priorità degli interventi di prevenzione durante il periodo della gravidanza e nella prima infanzia per modificare il corso delle malattie in età pediatrica e adulta;

creare una coorte rappresentativa di tutto il paese fornendo un credito importante per l'ingresso in un grande studio europeo;

creare una banca biologica per l'analisi di interazioni geni-ambiente.

Trasferibilità dei risultati

La raccolta di informazioni e di materiale biologico individuali potrà in futuro consentire di testare ipotesi etiologiche e valutative, proposte dalla rapida evoluzione delle conoscenze biomediche di base. Fatte salve le istanze che riguardano il consenso alla partecipazione alla ricerca e la confidenzialità dei dati, questo studio longitudinale potrà costituire una risorsa fondamentale per molti studi futuri. I medici e i pediatri, le famiglie, i responsabili della assistenza sanitaria, l'industria e le strutture di ricerca saranno gli utilizzatori finali del progetto.

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 cogenello;

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 cogenello. 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 20000 pazienti affetti da IBD è ipotizzabile l'identificazione di almeno 150-200 coppie di gemelli (1% circa della popolazione). Il totale di gemelli IBD sul numero delle coppie dipenderà dalla concordanza di malattia che è una delle misure che si vuole stimare in questo studio. Circa 1/3 delle coppie dovrebbe essere MZ.

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 di prevalenza e sopravvivenza su base di popolazione dei tumori ematologici

Lo studio si propone di analizzare sopravvivenza e prevalenza su base di popolazione dei tumori ematologici, ovvero linfomi, leucemie e mieloma multiplo. Ci si avvarrà principalmente dei dati di incidenza e stato in vita forniti dai registri tumori europei aderenti al progetto EURO CARE-4 (anni di diagnosi 1978-2002).

Le attività di ricerca previste nello studio si pongono i seguenti obiettivi:

Migliorare il livello di standardizzazione e comparabilità degli indicatori forniti dai registri su leucemie e linfomi maligni. Revisione delle pratiche di codifica della morfologia, per assicurare una stretta aderenza alla classificazione ICD-O e una maggiore armonizzazione con la classificazione clinica.

Integrare l'informazione diagnostica raccolta dai registri con le informazioni cliniche e diagnostiche sui pazienti arruolati nei *trial* clinici (*linkage* con i *database* delle reti cliniche europee). Fornire degli indicatori dell'attività clinica sui tumori ematologici nei vari Paesi europei, anche a supporto dell'interpretazione delle differenze geografiche nei livelli di sopravvivenza.

Stimare la sopravvivenza per gruppi morfologici specifici, piuttosto che per le grandi categorie nosologiche fornite abitualmente nelle statistiche dei Registri di popolazione.

Stimare la prevalenza dei tumori ematologici in Europa e la proporzione di pazienti guariti rispetto al totale dei sopravvissuti attraverso opportuni metodi statistici (*mixed models with cure*).

Risultati attesi nel triennio

Promuovere nell'ambito dei Registri Tumori europei l'utilizzo di sistemi di classificazione standardizzati, aggiornati e compatibili con le classificazioni usate dagli ematologi, che caratterizzano la diagnosi includendo in misura crescente informazioni molecolari.

Produrre stime aggiornate di sopravvivenza nei Paesi europei per i tumori ematologici, disaggregate per categorie morfologiche appropriate e rilevanti per il mondo clinico. Valutare l'impatto nella popolazione degli importanti avanzamenti diagnostici e terapeutici introdotti a partire dalla seconda metà degli anni '90 per molti dei tumori ematologici.

Produrre stime aggiornate di prevalenza per i tumori ematologici.

Trasferibilità dei risultati

Colmare il divario tra informazioni disponibili in sanità pubblica e esigenze del mondo della ricerca clinica.

Pianificazione delle risorse sanitarie specifiche: i tumori ematologici sono spesso cronici con necessità di trattamenti ciclici ripetuti e sequele di lungo termine.

Valutazione di esito e appropriatezza dei trattamenti su base di popolazione.

Studio Hera studio epidemiologico sul rischio di morte per cause improvvise o maldefinite durante i primi due anni di vita

Gli obiettivi dello studio sono quelli di valutare se le vaccinazioni effettuate nei primi due anni di vita incrementano il rischio di morte improvvisa a breve termine (nei giorni immediatamente successivi alla vaccinazione), confrontando i diversi vaccini disponibili in Italia. Lo studio condotto in collaborazione con il Ministero della Salute, l'AIFA e l'ISTAT, si articola in tre attività distinte. La prima riguarda la conduzione di una analisi secondo un modello di tipo "*case-series*" per stimare la possibile associazione tra vaccinazioni e SUD (*sudden unexpected deaths*). La seconda attività riguarda l'analisi dell'andamento della mortalità neonatale in Italia (con particolare riguardo alle SUD) nel periodo 1990-2001. La terza

attività riguarda l'analisi delle segnalazioni spontanee raccolte dal Sistema Nazionale di Farmacovigilanza nel periodo 1999-2004 di eventi avversi a vaccino.

Risultati attesi nel triennio

Sono state già completate alcune fasi dello studio. In particolare si è concluso l'analisi secondo il modello "case series" relativamente agli eventi di SUD che si sono verificati tra il 1999 e il 2003. Le analisi prodotte sono state oggetto di un rapporto ufficiale inviato alla agenzia europea EMEA. Si sta attualmente estendendo l'analisi a tutto l'anno 2004 con l'obiettivo di aumentare la potenza dell'analisi. È stata inoltre prodotta sotto forma di Rapporto Istisan una prima esaustiva descrizione della mortalità nei primi due anni di vita in Italia relativamente al periodo 1990-2001. In una successiva fase si prevede di analizzare in particolare le differenze geografiche e di approfondire gli aspetti relativi alla identificazione dei possibili determinanti di tali differenze. Si sta infine completando l'analisi delle segnalazioni spontanee di sospette reazioni avverse a vaccino in bambini nei primi due anni di vita per il periodo 1999-2004 con l'intento di descrivere e quantificare questo fenomeno. Per quest'ultima attività si vuole inoltre verificare un eventuale cambiamento nel tempo del tipo e della frequenza di reazioni riportate, rispetto ai prodotti in uso, e valutare il sistema di sorveglianza in termini di qualità dei dati raccolti.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio Hera fornirà per la prima volta in Italia un quadro esaustivo del fenomeno delle SUD in relazione agli andamenti temporali, geografici e a possibili associazioni con le vaccinazioni. Tali informazioni sono alla base anche di possibili interventi regolatori. Tutte le diverse attività dello studio saranno documentate attraverso Rapporti Istisan e pubblicazioni scientifiche. È prevista anche l'organizzazione di *workshop* con gli operatori delle Regioni.

Studio multicentrico sulle reazioni avverse a farmaci in pediatria

Lo studio è iniziato nel 1999 e coinvolge attualmente 4 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 (dal 2006 dovrebbe aggiungersi l'Ospedale Burlo-Garofolo di Trieste). Lo studio è coordinato dal Centro di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità. Vengono arruolati tutti i bambini, ricoverati tramite Pronto Soccorso, per le seguenti 4 patologie: piastrinopenie; lesioni esofago-gastroduodenali; disturbi del sistema nervoso centrale e neuropatie periferiche; malattie muco-cutanee non infettive e vasculiti. L'esposizione a farmaci dei 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 3 settimane (6 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 a un farmaco dei bambini ricoverati per una delle 4 patologie (casi) viene confrontata con l'esposizione dei bambini nelle 3 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 segnali di rischio provenienti dalle segnalazioni spontanee attraverso la conduzione di studi epidemiologici formali.

Produrre informazioni sull'appropriatezza d'uso.

Oltre a ricadute di tipo regolatorio il progetto può:

stimolare la segnalazione spontanea di reazioni avverse;
 servire di supporto alla Sottocommissione Nazionale di Farmacovigilanza;
 fornire *report* periodici sull'andamento dei risultati dello studio;
 organizzare seminari di aggiornamento e convegni annuali.

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, indicato per nausea e vomito, è risultata associata a sintomi extrapiramidali (Odds Ratio 390; Intervallo di Confidenza al 95% 61-2807). La nafazolina, indicato come decongestionante sia nasale che oculare e nel trattamento dei sintomi dell'otite, è risultata associata a depressione del sistema nervoso centrale (OR 19,6; IC95% 2,6-146). 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 (OR 4,9; IC95% 1,9-12,8). 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.

Studio sui possibili effetti neurocomportamentali associati all'esposizione a campi magnetici a 50Hz

Nell'ambito di uno studio epidemiologico sulla mortalità e morbosità di una popolazione esposta ad elevati livelli di campi magnetici valutazione della frequenza della sintomatologia neurocomportamentale in un gruppo di 250 persone attualmente residenti nell'area oggetto dello studio.

Risultati attesi nel triennio

Stima della frequenza della sintomatologia neurocomportamentale in relazione al livello di esposizione a campi magnetici.

Trasferibilità dei risultati

In Italia si stima che ci siano circa 60.000 persone esposte ad elevati livelli di campi magnetici. Questo studio secondo quanto suggeriscono le normative vigenti potrà contribuire a definire i possibili rischi associati a questa esposizione.

Studio sui vaccini anti HPV in Italia

Un consorzio di enti pubblici coinvolti a livello nazionale e coordinati dal CNESPS (Reparto Salute della Donna e dell'Età Evolutiva e Reparto Malattie Infettive) programmano attività di ricerca finalizzate alla raccolta di informazioni di tipo epidemiologico, farmacoeconomico e di profilo clinico dei nuovi vaccini per la prevenzione delle infezioni da HPV al fine di costruire, in modo accurato e completo, gli scenari di uso e il relativo impatto in termini di guadagno di salute e modifica dei costi del sistema.

Risultati attesi nel triennio

1) costruire la linea di base di frequenza del cancro della cervice in termini di incidenza e di mortalità per coorti di età delle donne italiane; 2) istituire un laboratorio di riferimento per la qualità degli esami mirati all'accertamento delle infezioni da HPV; 3) descrivere la distribuzione per tipo delle infezioni da HPV in un campione di donne potenziale *target* dell'offerta vaccinale e per area geografica; 4) effettuare sulle donne invitate a partecipare nelle varie aree geografiche un'indagine di accettabilità dell'offerta vaccinale e di partecipazione al successivo *trial*; 5) realizzare un *trial* di popolazione orientato a consolidare i dati di sicurezza e efficacia della vaccinazione e a valutare l'interazione di *screening* e vaccinazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati costituiranno la base per la definizione di politiche di Sanità Pubblica per la prevenzione del carcinoma del collo dell'utero anche mediante l'ausilio della vaccinazione contro l'HPV.

Studio sull'impiego nella pratica clinica della terapia dell'epatite cronica da virus epatite C con Interferone in Italia

La terapia ottimale (*gold-standard*) dell'epatite cronica da virus epatite C è rappresentata dalla combinazione dell'Interferone Peghilato (Peg-IFN) con la Ribavirina. Sono disponibili due tipi di Peg-IFN, l'alfa 2a della ditta Roche (Pegasys) e l'alfa 2b della ditta Schering (Peg-Intron). La scelta del farmaco è libera. Questa terapia dà effetti collaterali importanti e ha costi elevati. Nel territorio nazionale si stimano in 300-400.000 i soggetti infetti dall'HCV con epatite cronica C evolutiva candidabili alla terapia. Sono abilitati a trattare i pazienti 670 centri medici nazionali. Le informazioni medico/economiche sui due farmaci derivano finora dai dati di studi registrativi; è noto che la loro efficacia è comunque limitata in dipendenza soprattutto del genotipo virale (genotipo 1-4, 45-50% di cura per un anno di terapia; genotipo 2-3 ³ 80% di cura per 6 mesi di terapia) e dallo stato di avanzamento dell'epatopatia; nella pratica clinica nazionale esistono soltanto dati frammentari sulla modalità e appropriatezza di impiego, sulla tipologia dei pazienti trattati, sulle risposte terapeutiche e sulla tollerabilità dei farmaci impiegati.

Oggetto dello studio osservazionale saranno tutti i pazienti con epatite cronica C consecutivamente arruolati nell'arco di 24 mesi nei 20 maggiori centri italiani. Lo studio è proposto congiuntamente dalla Società Italiana Gastroenterologia (SIGE), dall'Associazione Italiana Studio Fegato (AISF) e dall'ISS e è coordinato dal prof. Mario Pizzetto, presidente della SIGE.

Saranno confrontati pazienti in trattamenti con i differenti interferoni in commercio: Pegasys (Roche) e Peg-Intron (Schering).

Risultati attesi nel triennio

Gli indicatori principali che potranno essere ottenuti attraverso questo studio saranno l'efficacia della terapia (l'eliminazione dell'HCV-RNA sierico, mantenuta 6-12 mesi dopo il termine della terapia, nella popolazione generale e nei sottogruppi), la tolleranza della stessa (effetti collaterali), i costi farmaceutici e sociosanitari per implementarla e completarla e l'efficacia relativa (in termini di eliminazione dell'HCV-RNA) dei due Peg-IFN.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio osservazionale sul territorio nazionale dei pazienti con epatopatia cronica C in trattamento consentirà di:

raccogliere i dati che permettano una valutazione delle modalità e appropriatezza di impiego e degli esiti delle terapie nei pazienti con epatite cronica C in Italia.

migliorare le conoscenze sulla gestione dei pazienti con epatite C, incluse la gestione di coloro che non rispondono alla terapia;

valutare l'aderenza alla terapia, gli effetti collaterali e il loro impegno socio-sanitario nella realtà italiana;

formulare linee guida per i pazienti difficili (ad es. anziani) e con comorbidità, basate sulla casistica ed esperienza nazionale;

recepire l'eventuale superiorità di uno dei due Peg-IFN al fine di ridurre il numero di trattamenti "inutili" con l'incremento del farmaco di maggiore efficacia.

Supporto alla Cabina di Regia nel governo del programma di attuazione del NSIS “MATTONE-Misura dell’*outcome*”

Il Piano del Progetto “Misura dell’*outcome*” nell’ambito del Supporto alla Cabina di Regia nel governo del programma di attuazione del NSIS, riguarda le valutazioni comparative degli esiti a livello dei soggetti erogatori e a livello della popolazione, che assumono rilievo particolare per gli obiettivi di fornire: al cittadino una visione trasparente dell’offerta di servizi e di prestazioni del SSN, a diversi livelli: attraverso i suoi soggetti erogatori pubblici e privati, per aree geografiche o regioni, monitorando eventuali modificazioni temporali; ai decisori istituzionali strumenti validi per scelte di programmazione, accreditamento, autorizzazioni, impiego delle risorse disponibili. Tutte le applicazioni di valutazione comparativa degli esiti implicano lo sviluppo e l’applicazione di metodi di controllo degli effetti di confondimento e valutazione delle modificazioni dell’esito. L’insieme di questi metodi è noto, nel campo della valutazione degli esiti, come *risk adjustment*. Il progetto sviluppa una serie di applicazioni, di diverso livello di complessità, descritte da specifiche schede sintetiche, redatte secondo un schema tipo uniforme. Per ciascuna applicazione vengono valutate le conoscenze disponibili nella letteratura scientifica e le applicazioni sistematiche già realizzate in altri paesi o in regioni.

Risultati attesi nel triennio

I risultati del progetto sono stati preventivamente discussi e pianificati e sono state definite le principali componenti progettuali, denominate *milestone*, da svolgere per il raggiungimento degli obiettivi del progetto e le sue relative finalità.

Analisi della situazione attuale: revisione sistematica della letteratura scientifica e ricognizione di esperienze nazionali e internazionali su analisi di *outcome* e sui relativi modelli di *risk adjustment*. Censimento le basi di dati esistenti e quelle in corso di costruzione, cercando di identificare eventuali carenze informative dei sistemi correnti, sia a livello nazionale che regionale.

La prima *milestone* è individuata nella selezione di un gruppo di patologie, trattamenti e indicatori su cui avviare l’analisi. Successivamente si procederà ad una classificazione di queste applicazioni sia in base alla complessità dei modelli di *risk adjustment* che richiedono, sia in base alla natura e alla disponibilità dei dati necessari per il loro sviluppo.

Nelle *milestones* successive, dopo aver definito categorie di bassa, media e alta complessità nelle quali gli indicatori preesistentemente selezionati verranno classificati, si procederà alla implementazione ed elaborazione dei modelli e degli indicatori per la misura e la valutazione dell’*outcome* di sistema e di popolazione appartenenti alle varie classi.

Trasferibilità dei risultati

Sia per quanto riguarda la valutazione comparativa dei soggetti erogatori che per la valutazione comparativa degli esiti a livello della popolazione assumono rilievo particolare gli obiettivi di fornire: al cittadino una visione trasparente dell’offerta di servizi e di prestazioni del SSN, a diversi livelli attraverso i suoi soggetti erogatori pubblici e privati, per aree geografiche o regioni, monitorando eventuali modificazioni temporali; ai decisori istituzionali strumenti validi per scelte di programmazione, accreditamento, autorizzazioni, impiego delle risorse disponibili.

Sviluppo di un servizio di salute mentale ottimale

Il progetto intende contribuire al miglioramento dell’organizzazione delle attività e degli esiti di un Dipartimento di Salute Mentale soprattutto per quanto riguarda i seguenti aspetti:

- valutazione sistematica della tipologia degli utenti e degli esiti degli interventi effettuati;
- diffusione degli approcci basati sulle evidenze scientifiche, in particolare per quanto riguarda gli interventi di psicoterapia di gruppo e la razionalizzazione dell’uso di psicofarmaci;

individuazione precoce e trattamento tempestivo ed efficace delle psicosi schizofreniche, secondo il modello messo a punto in Italia a Milano nell'ambito del cosiddetto Programma 2000;

promozione delle attività di inserimento lavorativo degli utenti del servizio;

coinvolgimento attivo degli utenti e dei familiari mediante la diffusione di interventi di psicoeducazione e la promozione dei gruppi di automutuoaiuto;

interventi di prevenzione dei disturbi mentali nella popolazione mediante la promozione di reti di supporto sociale e delle abilità di comunicazione e di *problem solving*.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione della cultura della valutazione, non solo in termini di volume di attività, ma anche di corrispondenza a evidenze scientifiche e di esiti ottenuti;

definizione e produzione di indicatori relativi a volume di attività, qualità professionale delle attività e risultati ottenuti;

trattamento estensivo dei disturbi d'ansia e di depressione segnalati dalla medicina di base, per cui, con gli attuali interventi, i dipartimenti di salute mentale non hanno risorse sufficienti;

riduzione del tempo intercorrente tra insorgenza dei disturbi psichiatrici e primo trattamento efficace;

riduzione dei "nuovi cronici" e recupero dei "vecchi cronici";

miglioramento delle relazioni interpersonali nella comunità e possibile riduzione dell'incidenza dei nuovi disturbi psichiatrici di tipo depressivo e ansioso.

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione di un modello di Dipartimento di Salute Mentale così concepito potrà costituire un forte stimolo per la diffusione di almeno alcune delle sue componenti.

Uso degli aminoacidi ramificati e rischio di sclerosi laterale amiotrofica

Verranno somministrate elevate quantità di aminoacidi ramificati a un gruppo di topi transgenici mutati nel gene della superossido dismutasi. Gli esperimenti verranno effettuati su modelli *in vivo* e *in vitro*. Tali animali costituiscono modello sperimentale di SLA ampiamente riconosciuto dalla comunità scientifica.

Risultati attesi nel triennio

Valutare se l'esposizione ad aminoacidi ramificati possa influenzare la storia naturale di questi animali affetti da SLA sperimentale.

Trasferibilità dei risultati

In considerazione dell'elevato consumo di aminoacidi ramificati tra gli sportivi (professionisti e non) i risultati dello studio potranno contribuire a definire se questi comportamenti alimentari possano incrementare il rischio di SLA nella popolazione generale.

Valutazione dei fattori genetici e ambientali in una coorte di gemelli con sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

Gli obiettivi sono: 1)stimare il contributo dei fattori genetici e ambientali nello sviluppo della SLA tramite un'indagine su base di popolazione della concordanza di malattia nelle coppie di gemelli monozigoti e dizigoti; 2)nelle coppie concordanti, valutare il tempo di discordanza di malattia tra i due gemelli; 3)raccogliere nella banca biologica del CNESPS, il materiale biologico per ulteriori studi, proposti dai membri del progetto e in collaborazioni nazionali e internazionali (EURALS). Il progetto è in collaborazione con il gruppo di ricerca italiano sulla SLA che ha una esperienza riconosciuta a livello internazionale, ed è costituito da neurologi di riferimento dei Registri regionali e dei coordinamenti dei Centri SLA.

I casi di SLA saranno individuati attraverso i registri SLA delle Regioni Piemonte, Lombardia e Puglia, il coordinamento degli archivi ospedalieri dei Centri SLA delle Regioni Marche, Emilia Romagna, Toscana e Lazio e il registro dei soci iscritti all'AISLA (Associazione Italiana SLA). I gemelli con SLA saranno identificati attraverso un *record-linkage* dei casi di SLA con il Registro Nazionale Gemelli. I neurologi di riferimento verificheranno la condizione di gemello, valideranno la diagnosi di SLA nel probando, raccoglieranno i dati anamnestici e eseguiranno l'esame clinico del cogemello. Un campione biologico sarà raccolto da entrambi i gemelli di ogni coppia per l'attribuzione della zigosità e per la ricerca di mutazioni nel gene SOD1.

Risultati attesi nel triennio

In Italia è ipotizzabile l'individuazione di circa 55 gemelli. Assumendo una frequenza di SLA familiare del 5%, 2-3 coppie saranno membri di famiglie SLA. Infine, se saranno mantenuti i rapporti della popolazione generale (2/3 DZ e 1/3 MZ) si stima un numero di coppie attese pari a circa 37 DZ e 18 MZ.

Compatibilmente con il numero delle coppie di gemelli reclutate e, quindi, con la potenza dello studio, potrà essere valutata la concordanza per malattia *casewise* e *pairwise* nei gemelli MZ e DZ. Dalla concordanza si può ricavare il rapporto del rischio di ricorrenza, che è una misura di rischio genetico. Essa è definita dal rapporto tra la concordanza *casewise* e la prevalenza della patologia nella popolazione generale, e è interpretabile come rischio relativo di malattia in un co-gemello di un gemello affetto rispetto ad un individuo nella popolazione.

Tramite il metodo di Kaplan-Meyer, si potrà stimare l'incidenza cumulativa nei co-gemelli entro un opportuno periodo, e anche effettuare un confronto tra MZ e DZ. Se si ricorre al metodo di Cox, il confronto tra MZ e DZ può tenere conto di possibili confondenti. Un rischio di malattia più elevato in co-gemelli di probandi MZ può essere assunto come indice di influenze genetiche. Un parametro di particolare rilievo è l'ereditabilità, cioè la proporzione della varianza fenotipica dovuta ai fattori genetici, che misura il contributo dei geni alla variabilità inter-individuale osservata.

Trasferibilità dei risultati

La ricaduta immediata dello studio attiene all'ambito clinico: le stime emerse saranno utili per la consulenza sul rischio di ricorrenza della malattia in ambito gemellare e familiare. Le ricadute a lungo termine riguardano la comprensione del ruolo dei fattori ambientali, genetici ed epigenetici nel meccanismo della malattia.

Valutazione dei percorsi assistenziali nel governo clinico delle demenze

Studio osservazionale di due gruppi di pazienti affetti da demenza. Il primo inserito in un percorso assistenziale strutturato, il secondo assistito in maniera non coordinata dalle diverse strutture socio-sanitarie.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio ha la finalità di rilevare se i pz con demenze e i relativi *caregiver* che vengono presi in carico nell'ambito di una rete socio-sanitaria strutturata possano e in che misura ricevere un beneficio rispetto ai pazienti che vengono invece assistiti in maniera non coordinata dalle diverse strutture.

Trasferibilità dei risultati

Razionalizzazione della rete delle 503 Unità di Valutazione Alzheimer attivate nell'ambito del Progetto CRONOS e stima dei benefici attesi per i pazienti *caregiver* del Sistema Sanitario Nazionale.

Valutazione del profilo di mortalità e del rischio di neoplasie tra il personale aeronavigante dell'Aviazione Civile Italiana in relazione alla esposizione a radiazioni cosmiche ionizzanti

Studio del profilo di mortalità del personale navigante Alitalia comparativamente alla popolazione italiana

Valutazione dell'esposizione a radiazione ionizzante cosmica individuale cumulativa durante l'attività, 1965-1995.

Studio dell'associazione tra dose di radiazione assorbita e rischio di neoplasia

Partecipazione allo studio Europeo, BIOME ESCAPE "Pilots and Crew"

Studio delle condizioni di salute e di fertilità tra le assistenti di volo

Studio della prevalenza di condizioni morbose tra i piloti da revisione degli esami periodici per il rilascio di licenze di volo.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione della dose di radiazione cumulativa nella vita lavorativa. Studio dell'associazione tra dose e rischio di neoplasia per le diverse categorie di personale. Studio sulla salute delle donne assistenti di volo. studio della prevalenza di patologie croniche tra i piloti in riferimento alla popolazione generale.

Si prevede un aggiornamento dei dati della coorte sia in termini di attività di volo sia di ricerca di stato in vita al 2004, per una nuova analisi con valutazione dell'esposizione stimata con metodi più innovativi e molto più precisi.

Trasferibilità dei risultati

Valutazione del rischio di tumore per il personale navigante utile per la definizione della normativa in materia di protezione

Valutazione dell'esposizione a organoalogenati persistenti e rischio di endometriosi. Studio caso-controllo

Nell'ambito del progetto di ricerca corrente: "Esposizione a organoalogenati persistenti: valutazione del rischio per la salute riproduttiva femminile" è stato condotto uno studio caso-controllo per valutare l'esposizione a diossine, PCB e analoghi strutturali bromurati quale fattore di rischio nell'endometriosi.

Lo studio, condotto in collaborazione tra l'ISS e la Clinica Ostetrica e Ginecologica del Policlinico Umberto I di Roma, prevedeva l'arruolamento di 80 donne affette da endometriosi e altrettanti controlli "sani". Tutte le donne sono state sottoposte a laparoscopia o laparotomia per endometriosi (casi) o altra patologia benigna (controlli).

Prima dell'intervento venivano prelevati campioni di sangue per la successiva analisi di una serie di inquinanti persistenti ad elevata tossicità, in particolare di policlorobifenili (PCB) e polibromodifenileteri (PBDE).

A tutte le donne è stato somministrato un questionario per la raccolta di informazioni, quali il livello socio economico, la storia riproduttiva e le abitudini alimentari, utili per la definizione della storia espositiva.

Risultati attesi nel triennio

Al termine dell'arruolamento dei casi e dei controlli e delle determinazioni di laboratorio tutte le informazioni verranno raccolte in unico *database*.

Una prima analisi riguarderà il confronto delle caratteristiche generali dei rispondenti e delle donne che hanno rifiutato di partecipare allo studio, successivamente verranno calcolate le frequenze dei diversi fattori di rischio nei casi e nei controlli e calcolati gli *odds ratio* grezzi e gli intervalli di confidenza al 95%.

Sulla base della significatività statistica e della plausibilità biologica alcune delle variabili in studio verranno scelte e utilizzate per l'analisi multivariata. Un modello di regressione logistica verrà utilizzato per stimare gli odds ratio aggiustati e comprendere la relazione tra endometriosi e inquinanti persistenti ad elevata tossicità.

Se saranno disponibili informazioni di tipo genetico, relative sia ai casi che ai controlli, si valuterà la componente genetica e ambientale separatamente e l'effetto dell'eventuale interazione gene-ambiente.

Trasferibilità dei risultati

L'esposizione a diossine è stata identificata tra i potenziali fattori di rischio di patologie dell'apparato riproduttivo, quali l'endometriosi.

Questo studio grazie all'arruolamento di casi e di controlli per i quali è stata verificata la presenza/assenza di endometriosi (tramite laparotomia o laparoscopia) e alla dettagliata caratterizzazione dei livelli di esposizione con lo studio dei meccanismi di azione a livello endocrino e metabolico, consentirà di definire il rischio di endometriosi nella popolazione femminile in funzione dei diversi livelli espositivi.

Valutazione della applicabilità e della estendibilità a livello nazionale di un modello di valutazione del costo-efficacia degli interventi di protesi di anca (Linea di ricerca all'interno del progetto ex art.12 "Analisi costo-efficacia degli interventi di artroprotesi di anca", coordinamento Regione Emilia Romagna 2003-2006)

L'importanza di monitorare le *performance* a lungo termine degli interventi di protesi d'anca è sempre più evidente in letteratura. Nel 2003 in Italia sono stati effettuati circa 78.000 interventi di artroprotesi di anca. In Emilia Romagna, dove è attivo dal 2000 il Registro regionale dell'Implantologia Protesica Ortopedica (RIPO), vengono utilizzate circa 90 tipologie differenti di protesi d'anca e l'incidenza degli interventi è 100/100.000 residenti per le artroprotesi e 48/100.000 per le endoprotesi. Il costo del materiale protesico utilizzato è estremamente variabile. L'efficacia delle diverse tipologie è attualmente monitorata dal RIPO in termini di incidenza di reimpianto, ma manca una vera e propria analisi del rapporto costo-efficacia. L'obiettivo dello studio è quello di eseguire un confronto tra i costi delle diverse tipologie di protesi e gli esiti che verranno espressi sia come sopravvivenza della protesi, sia in termini di qualità della vita utilizzando questionari somministrati ai pazienti (WOMAC, SF36).

Per allargare la base di analisi e valutare la fattibilità di una diffusione nazionale delle metodologie implementate è prevista sia la raccolta nelle Regioni partecipanti di dati analoghi a quelli raccolti per le strutture emiliano-romagnole sia la partecipazione dell'ISS per i risultati conseguiti in altri progetti volti alla realizzazione del Registro nazionale (definizione dei flussi informativi e delle metodologie di valutazione dell'esito).

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo dell'attività dell'Unità Operativa ISS è la valutazione della fattibilità dell'introduzione del modello proposto in un futuro registro nazionale e la sua applicazione a tutte le Regioni. Tale modello si baserà sui risultati raggiunti nelle Regioni pilota partecipanti al progetto e terrà conto delle realtà presenti nelle altre Regioni non partecipanti al progetto. A tal fine verrà predisposto un rapporto sulla dislocazione sul territorio nazionale dei centri ortopedici e verranno proposte e implementate metodologie di valutazione dell'esito basate sulla misura della qualità della vita. Attraverso la collaborazione con le altre unità operative verranno individuati i modelli di protesi presenti sul mercato italiano

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità al Servizio Sanitario Nazionale sarà possibile fin dal termine del progetto, fornendo agli organi preposti un modello pilota per le valutazioni costi-efficacia delle protesi d'anca

Valutazione dello stato cognitivo in coppie di gemelli anziani

Il progetto, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Neurologiche, dell'Università "La Sapienza" di Roma, si propone di studiare il contributo dei fattori genetici e ambientali nello sviluppo di *deficit* cognitivi in un gruppo di soggetti di età superiore ai 60 anni.

Tramite la consultazione del "Registro Nazionale dei Gemelli" sono state individuate le coppie di gemelli residenti nel Comune di Roma e tutti i soggetti che hanno accettato di partecipare allo studio sono stati contattati telefonicamente e intervistati. Ad ogni soggetto è stato somministrato un questionario composto da variabili mirate alla comprensione dello stato di salute e delle più importanti caratteristiche socio-demografiche e nell'ultima parte da un *test* "mini-mental State examination" (MMSE) atto a far emergere casi di sospetto deficit cognitivo. Successivamente i gemelli intervistati venivano invitati a recarsi presso il Dipartimento di Scienze Neurologiche per una valutazione neuropsicologica completa.

L'arruolamento dei soggetti è iniziato da circa 4 anni e ad oggi sono state intervistate 386 coppie di gemelli. Lo studio si propone di: a) analizzare le informazioni raccolte al momento dell'intervista telefonica; b) analizzare i risultati della batteria di *test* neuropsicologici eseguiti in ambulatorio; c) arruolare nuovi soggetti residenti nel Comune di Roma che hanno raggiunto l'età di 60 anni; d) seguire nel tempo le coppie di gemelli arruolate per una rivalutazione dello stato cognitivo.

Risultati attesi nel triennio

Le coppie di gemelli arruolate verranno divise sulla base della zigosità stimata (monozigoti, dizigoti concordanti per sesso e dizigoti discordanti per sesso) e successivamente analizzate utilizzando tecniche specifiche per l'analisi dei gemelli.

Verrà valutata la concordanza per malattia *casewise* e *pairwise* nei gemelli monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ) e si utilizzeranno modelli di equazioni strutturali per la determinazione della componente genetica, ambientale condivisa e non condivisa. Compatibilmente con il numero di gemelli arruolati verranno calcolati gli intervalli di confidenza al 95% e utilizzati modelli multivariati.

Utilizzando i dati di *follow-up* verrà calcolato il tasso di progressione generale e distinto per zigosità.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio potranno fornire lo spunto per nuove ricerche ed essere utilizzate in ambito clinico per valutazione dei *deficit* cognitivi nel caso di pazienti gemelli.

Valutazione nazionale delle strutture per il ricovero di pazienti psichiatrici acuti: il progetto PROGRES-acuti

Verrà portato a termine il progetto che ha riguardato il censimento di tutte le strutture psichiatriche di ricovero di pazienti con disturbi mentali in condizioni di breve o medio-degenza (Servizi Psichiatrici di Diagnosi e Cura [SPDC], Case di Cura psichiatriche convenzionate, Cliniche Psichiatriche Universitarie [CPU] e Centri di Salute Mentale [CSM] con posti-letto) presenti nel territorio di 16 Regioni e Province Autonome (P.A.), la valutazione approfondita di un campione rappresentativo di queste differenti strutture di ricovero, e la valutazione comparativa nelle varie tipologie di strutture di un campione rappresentativo di pazienti per definirne i profili clinici. In particolare:

Verranno condotti il controllo di qualità e l'analisi statistica dei dati raccolti dell'intero progetto e coordinate la preparazione di articoli scientifici da pubblicare su riviste nazionali e internazionali e la preparazione di una monografia che riporti in dettaglio i risultati conseguiti;

Verrà curata l'organizzazione di un congresso per presentare i risultati della ricerca.

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.

Valutazione sulla possibile associazione tra fibrosi valvolare e uso di dopaminoagonisti di tipo ergot nella malattia di Parkinson

Lo studio osservazionale prevede di valutare mediante l'esecuzione di un ecocardiogramma color doppler la frequenza di insufficienza valvolare tra i pazienti parkinsoniani in relazione all'esposizione al farmaco. Successivamente nel gruppo di pazienti privi al *baseline* di questa condizione verrà effettuato un secondo ecocardiogramma a distanza di un anno per stimare l'incidenza di insufficienza valvolare.

Risultati attesi nel triennio

Stimare l'eventuale rischio di fibrosi valvolare associato all'esposizione di una categoria di farmaci ampiamente utilizzati nella terapia della malattia di Parkinson (dopaminoagonisti tipo ergot).

Trasferibilità dei risultati

Modifica o meno della terapia antiparkinsoniana adottata nella pratica clinica corrente

VENICE (Vaccine European New Integrated Collaborative Effort)

Le vaccinazioni sono il più importante strumento di prevenzione primaria per le malattie infettive. Decisioni sui tipi di vaccino da usare, calendario vaccinale e strategie da adottare, spettano sinora alle autorità sanitarie nazionali nei diversi stati membri dell'unione europea. Questo, nonostante il fatto che le politiche vaccinali abbiano un impatto che 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.

Ad esempio, molti Paesi hanno calendari vaccinali e prodotti simili, ma nonostante i vaccini debbano sottostare ad una normativa regolatoria europea per essere introdotti sul mercato, non vi è stato sinora uno sforzo di unire conoscenze e esperienze con un approccio sistematico.

Attualmente in Europa vi sono numerosi progetti volti alla sorveglianza e allo studio di singole malattie prevenibili da vaccino, ma non progetti volti ad affrontare la tematica delle strategie vaccinali con un approccio comune. Vi è quindi necessità di approfondire le conoscenze su come vengono effettuate le vaccinazioni negli stati membri, stabilire indicatori comuni per monitorare i programmi vaccinali, definire i processi decisionali, identificare i *gap* tra i 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.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo del progetto Venice è di promuovere la raccolta e diffusione in Europa delle conoscenze e delle *best practices* in materia di vaccinazioni nonché di favorire lo sviluppo di un *network* all'interno della comunità europea per la sorveglianza e il monitoraggio dei programmi di vaccinazione.

Il progetto è diviso in 5 *working packages* (WPs), ognuno dei quali affidato a uno stato membro dell'Unione europea. All'Italia sono affidati i WPs 1 (coordinamento) e 2 (disseminazione dei risultati).

I risultati attesi del progetto sono:

creare un *network* riguardante le vaccinazioni in grado di raccogliere ed elaborare informazioni sui programmi di vaccinazione in atto in ciascuno degli stati membri

integrare strumenti e conoscenze disponibili, per fornire pareri e supporto ai singoli stati membri in materia di questioni riguardanti le vaccinazioni.

creare un *network* in grado di supportare lo sviluppo di programmi di vaccinazione in un'ottica comune.

definire indicatori comuni dei programmi di vaccinazione per confrontare le diverse strategie vaccinali dei paesi europei, anche a livello delle realtà regionali dei singoli stati.

incoraggiare un approccio razionale ai processi decisionali riguardanti le politiche vaccinali, fornendo strumenti standardizzati.

fornire agli stati membri le informazioni e il supporto necessario per la corretta gestione delle questioni riguardanti gli eventi avversi alle vaccinazioni.

Trasferibilità dei risultati

Il risultato più importante in termini di trasferibilità è la creazione di un sito *web* del progetto da utilizzare come piattaforma comune per la raccolta e diffusione delle informazioni riguardanti le politiche vaccinali negli stati membri. Il sito *web* costituirà anche lo strumento principale per la creazione di un *network* comune di esperti in tematiche concernenti le vaccinazioni. Verranno inoltre condotti tre *workshop*, che consentiranno di:

organizzare i lavori e identificare le persone responsabili all'interno degli stati membri;

stabilire le metodologie da usare per la scelta delle priorità e dei processi decisionali;

valutare i risultati ottenuti e stabilire ulteriori collaborazioni tra gli stati membri.

**Centro Nazionale
di 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 studies*), sono studi che hanno vantaggi sia degli studi di coorte sia degli studi caso-controllo: sono protetti dai *bias* di selezione e di informazione, 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 *paillettes*, contenute in *visotubes*, disposti in *gobelettes*, 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 sei studi prospettici: Il progetto CUORE, GENOMEUTWIN, IPREA, il Registro delle demenze.

I 4 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

Oltre al mantenimento della banca, attività prevista per il prossimo triennio, viene descritta l'attività programmata nell'ambito Progetto CUORE – Epidemiologia e prevenzione delle malattie cardiovascolari - relativa ai campioni biologici della sezione Studi longitudinali. Nelle coorti MATISS e MONICA_Area Latina sono stati identificati 205 casi con campione biologico DNA; sono stati estratti 585 controlli appaiati con i casi per età e sesso. Sui campioni biologici di questi soggetti verranno effettuate misure di polimorfismi (SNPs) di geni candidati al rischio cardiovascolare e tumorale. I primi geni che verranno analizzati saranno il gene dell'IL1 beta, del fattore tissutale della coagulazione e delle metalloproteasi. Inoltre una volta pubblicate le mappe SNPs verrà effettuata un'analisi dell'intero genoma per evidenziare associazioni tra aplotipi e pattern genomici con il rischio di malattie cardiovascolari e di tumori. Il DNA verrà estratto con tecniche standardizzate sia manuali che automatizzate. La misura dei genotipi verrà effettuata con metodi di amplificazione genica mediante PCR e rivelazione mediante corsa su gel, *real time* PCR, sequenziamento o spettrometria di massa. I risultati ottenuti verranno elaborati con tecniche statistiche standardizzate, mediante analisi di popolazione. Non verranno effettuate analisi individualizzate ai singoli campioni. Il laboratorio in cui si svolgeranno i *test*

genetici riceverà solo provette anonime marcate con codici a barre, senza alcuna possibilità di risalire all'identità del campione. Una volta estratto il DNA verrà creato un *database on line* (ad accesso ristretto) con indicata la quantità e la purezza del DNA estratto per ogni campione. Per ogni *test* effettuato verrà riportata nel tempo la quantità di DNA utilizzato, così sarà sempre possibile sapere cosa è stato usato, da chi e quanto DNA rimane disponibile. Il DNA estratto verrà diviso in due aliquote, una chiamata *banking solution* verrà ristoccata a -80°C per formare una nuova banca, l'altra chiamata *stock solution* verrà tenuta a -20°C e utilizzata per le analisi in programma. A tale scopo, dalla *stock solution* verrà derivata una *working solution* diluita alle concentrazioni di DNA necessarie per ciascun *test*. Questo assicura di evitare inquinamenti e sprechi del campione.

Controllo di stato riguardo alla potenza di vaccini batterici e virali

Su richiesta del Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate, Il Reparto Salute della Donna e dell'Età Evolutiva 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. Mediamente in un anno vengono eseguiti circa 15 controlli. Sempre su richiesta del Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate, il Reparto si occupa della valutazione statistica dell'attività antidifterica e antitetanica dei vaccini antidiftotetanici. Mediamente in un anno vengono eseguiti circa 3 controlli.

Piano triennale

La valutazione statistica relativamente alla sicurezza, mediante saggio di neurovirulenza, dei vaccini OPV (antipolio orale) verrà sistematicamente informatizzata, così come lo sarà la valutazione statistica relativamente alla potenza di vaccini antidiftotetanici.

Ciò al fine di garantire il mantenimento della qualità del controllo e la sua gestione da parte di altri ricercatori.

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 del Servizio Sanitario Nazionale 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 9 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 del 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

L'intento formativo del CNESPS per l'attività nazionale è quello di progettare, realizzare e valutare un'attività formativa offerta alle strutture del SSN e orientata a promuovere la realizzazione degli obiettivi di salute del Paese attraverso la qualificazione del personale.

La pianificazione, strategica e operativa, della formazione tiene conto anche di diversi elementi attuali, quali i bisogni formativi delle strutture del SSN, in particolare delle ASL, i Livelli Essenziali di Assistenza (LEA) e la domanda di formazione creatasi in seguito ai progetti del CCM e all'implementazione del Programma Nazionale di Prevenzione 2005-07.

Il CNESPS ha elaborato un'offerta formativa di corsi tradizionali, cioè di corsi residenziali di alcuni giorni, con lezioni frontali e esercitazioni teoriche, in un pacchetto di formazione di base già ampiamente richiesta. I corsi di formazione coprono diverse aree tematiche tra cui l'epidemiologia di base, applicata, conoscitiva, la biostatistica, il rischio e la sua comunicazione in campo sanitario, la valutazione dei risultati e della qualità, la salute riproduttiva e l'applicazione di *software* epidemiologici.

Accanto a corsi prevalentemente teorici verranno realizzati dei corsi che siano il più possibile contestualizzati, così che i discenti abbiano l'opportunità di applicare i metodi a una situazione reale e attuale.

È considerato essenziale approfondire l'analisi dei bisogni formativi insieme ai *partner* regionali per identificare gli ambiti di intervento prioritari e concordare eventuali piani operativi condivisi e le tipologie di formazione necessarie. Si potranno in questo modo costruire percorsi formativi specifici orientati all'azione, monitorarne la realizzazione e valutarne i risultati.

Per mantenere alti gli standard qualitativi, il CNESPS sta realizzando nuovi strumenti di valutazione e progettando il follow up post formazione; si propone, in particolare, di valutare la qualità e l'efficacia dei corsi formativi mediante appositi strumenti, integrativi a quelli ECM. Gli strumenti adottati serviranno a rilevare:

- il gradimento dei partecipanti;
- l'impressione soggettiva di apprendimento;
- l'apprendimento oggettivo mediante Pre e Post-test;
- l'impatto a distanza di tempo.

Il Centro intende migliorare la qualità e l'efficacia dei corsi proposti anche attraverso la programmazione di corsi di qualificazione, per le persone identificate per l'insegnamento, nell'ambito della metodologia di formazione degli adulti; questo processo sarà utile anche per poter disporre di persone-risorsa da utilizzare per la formazione nelle Regioni.

Per meglio coordinare la formazione, si prospetta inoltre l'intento di creare un sistema interno per la gestione di tutti i corsi del CNESPS.

La realizzazione dei progetti sopra menzionati, iniziata nell'ultimo semestre del 2005, si svilupperà nei prossimi anni con l'intento di rinnovare l'approccio formativo del Centro.

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. 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, il Reparto svolge la 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 il Reparto Epidemiologia delle Malattie Infettive ha condotto tali attività sia in qualità di *Rapporteur* o *Co-rapporteur* che come *Assessor* nazionale. In particolare, ha svolto funzione di *Rapporteur* per il vaccino Varivax antivaricella, e di *Co-rapporteur* per il vaccino esavalente Hexavac contro difterite, tetano, pertosse, poliomielite, epatite B, Haemophilus influenzae tipo b, e il vaccino tetravalente Proquad, contro morbillo, rosolia, parotite e varicella). L'attività di *Assessor* è stata svolta per numerosi prodotti autorizzati con procedura centralizzata o di mutuo riconoscimento (ad es. Infanrix Hexa, Neisvac-c, Prevenar, Menjugate, Menivact, Polioinfanrix) mentre su mandato dell'AIFA sono state svolte valutazioni di prodotti autorizzati con procedura nazionale (ad es. vaccino Morupar contro morbillo, rosolia e parotite).

Piano triennale

L'attività di revisione e valutazione della documentazione clinica a corredo delle domande di registrazione e delle valutazioni *post-marketing* dei vaccini proseguirà nel triennio 2006-2008, su mandato delle autorità nazionali e internazionali. 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. Ognuno dei *trial* sottomessi come parte della parte IV dei *dossier* verrà quindi esaminato per quanto riguarda il disegno dello studio, le sue assunzioni di base, i metodi statistici adottati per l'analisi, e i risultati ottenuti. Verranno quindi formulate alla ditta eventuali domande di chiarimento ed espresso un commento finale circa l'opportunità di autorizzare il prodotto, eventuali limitazioni d'uso e necessità di condurre ulteriori valutazioni *post-marketing*. Verranno inoltre valutati gli stampati allegati (Riassunto delle caratteristiche del prodotto, foglietto illustrativo), per verificarne l'accuratezza, completezza e concordanza con i risultati ottenuti dagli studi clinici. Procedure analoghe verranno adottate per valutare i dati degli studi clinici di fase IV, utilizzati per le valutazioni *post-marketing*.

Sistema di sorveglianza epidemiologica dell'interruzione volontaria di gravidanza

Raccolta trimestrale, mediante questionario, dei dati regionali relativi alle IVG. Verifica della qualità e della congruenza dei dati attraverso una costante attività di controllo, con contatto attivo e continuo con le diverse realtà regionali. Analisi dei dati e presentazione dei risultati sia a livello nazionale che regionale. Predisposizione della Relazione per il Ministro della Salute sulla attuazione della Legge contenente norme per la tutela sociale della maternità e per l'interruzione volontaria di gravidanza (Legge 194/78) che viene presentata annualmente al Parlamento. Ritorno dell'informazione alle Regioni, anche attraverso incontri annuali.

Piano triennale

L'attuale evoluzione dell'andamento dell'interruzione volontaria di gravidanza indica la costante diminuzione del ricorso all'aborto tra le cittadine italiane e il sempre maggiore contributo delle cittadine straniere. Quest'ultimo è dovuto all'aumento della presenza di stranieri in Italia e al maggior rischio, rispetto alle italiane, di incorrere in gravidanze non desiderate. Si propone quindi una più attenta sorveglianza.

Verrà analizzata l'evoluzione del fenomeno nelle diverse articolazioni sociali delle donne in età feconda, considerati anche gli aspetti del funzionamento dei servizi consultoriali, potenziati con una mediazione culturale.

In tale ambito verrà allestito un sistema esperto interrogabile *on line* sull'andamento temporale del fenomeno per specificate caratteristiche socio-demografiche delle donne e per modalità di intervento, per permettere la massima diffusione dell'informazione disponibile. Uno studio particolare riguarderà gli esiti riproduttivi delle procedure consultoriali nel percorso relativo all'interruzione volontaria di gravidanza.

Sorveglianza delle malattie cardiovascolari

Nonostante la frequenza delle malattie cardiovascolari, non esiste nel nostro paese un sistema nazionale di sorveglianza delle malattie cardiovascolari arteriosclerotiche e di valutazione del loro impatto sociale. L'unico indicatore disponibile su scala nazionale è rappresentato dalla mortalità. Il registro nazionale per la sorveglianza degli eventi coronarici e cerebrovascolari (costituito su 8 aree rappresentative di macroaree geografiche) permette di stimare l'impatto delle malattie in termini di mortalità totale e prematura, la morbosità ospedaliera, la frequenza di disabilità, la percentuale di sopravvivenza sia extra che intra ospedaliera, i costi della diagnosi, del trattamento e i vantaggi derivati dal ricovero in strutture di terapia intensiva e semi-intensiva. L'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (50 centri distribuiti al Nord, Centro e Sud Italia) permette di valutare la distribuzione e il *trend* dei fattori di rischio cardiovascolare nella popolazione generale. L'EUROCISS- *health monitoring* ha il fine di stilare raccomandazioni in collaborazione con gli altri Paesi dell'unione europea per la sorveglianza della morbosità cardiovascolare a livello internazionale. Tali attività costituiscono la modalità più efficace per stimare l'impatto delle malattie cardiovascolari e per valutare iniziative di prevenzione primaria e secondaria.

Piano triennale

Obiettivo della presente attività è quello di valutare l'impatto sociale delle malattie cardiovascolari di origine arteriosclerotica. Si articola nelle seguenti attività:

1. riattivazione delle aree del registro nazionale degli eventi coronarici e cerebrovascolari al fine di valutare a 5 anni di distanza dalla prima determinazione (1998-99) l'impatto delle malattie cardiovascolari di origine arteriosclerotica (infarto del miocardio, *ictus*). La metodologia applicata è standardizzata e validata dalla precedente esperienza, in modo da permettere il confronto. L'appaiamento dei dati di mortalità e delle diagnosi di dimissione ospedaliera permette, assieme alla validazione di un campione di eventi consecutivi, di identificare i valori predittivi positivi dei singoli codici delle malattie cardiovascolari, al fine di stimare gli eventi correnti fatali e non fatali, coronarici e cerebrovascolari e valutarne la letalità.

2. Riattivazione dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare: 50 centri distribuiti sull'intero territorio nazionale (1 ogni milione e mezzo di abitanti, incluso uno anche nelle regioni con popolazione inferiore) vengono selezionati per arruolare una coorte di 10.000 persone di età compresa fra 35 e 74 anni. Le informazioni raccolte (stile di vita) e le misure effettuate (pressione arteriosa, quadro ematochimico lipidico e glucidico, misure antropometriche) permettono di valutare l'andamento dei fattori di rischio, delle condizioni a rischio e delle malattie cardiovascolari, confrontandole con l'indagine simile condotta tra il 1998 e il 2002.

3. Con i dati disponibili del Progetto CUORE (incidenza prevalenza, consumo di farmaci cardiovascolari, ricoveri ospedalieri, fattori di rischio) utilizzando il modello IMPACT, realizzato da Simon Capewell, *Department of Public Health*, University of Liverpool, valutare l'andamento in discesa della mortalità per cardiopatia coronaria identificando la parte attribuibile alle procedure terapeutiche in prevenzione secondaria, ai trattamenti in prevenzione primaria e ai cambiamenti dello stile di vita.

4. Il programma EUROCISS – *cardiovascular indicator surveillance set*- nell'ambito de *Health Monitoring Programme* realizza e aggiorna l'inventario delle fonti di informazione e le metodologie adottate nei vari paesi per la sorveglianza delle malattie cardiovascolari di maggior frequenza e con maggiori possibilità di successo nel campo della prevenzione primaria.

Le rilevazioni dei punti 1, 2 e 3 sono fondamentali per valutare l'effetto sulle malattie cardiovascolari e sul rischio da attribuire alla introduzione della legge antifumo a protezione dei non fumatori e alla introduzione della carta del rischio cardiovascolare nella pratica clinica.

Ufficio di Statistica

L'Ufficio di Statistica dell'Istituto Superiore di Sanità, 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 Decreto Legislativo 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 e 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 decreto legislativo 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 predispone 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 e 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.

L'Ufficio di Statistica 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 prevee 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 del Servizio Sanitario Nazionale, che riceve un cospicuo numero di "crediti" ECM.

Piano triennale

Nell'ambito degli adempimenti annuali previsti dal Decreto Legislativo 6 settembre 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 dei seguenti Circoli di Qualità: "Sanità", "Territorio", "Ambiente" e "Struttura e dinamica della popolazione", che lavoreranno 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 allorchè rivestano carattere "prototipale", cosicchè 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.

Le proposte presentate dall'Ufficio di Statistica verranno discusse e vagliate nei Circoli di Qualità.

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 2006-2008 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.

In ciascun anno del triennio 2006-2008 verrà organizzato presso l'Istituto Superiore di Sanità il corso per operatori del Servizio Sanitario Nazionale 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'ultima essa sarà affidata per due volte (2006 e 2008).

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 epidemio-geni), di dimostrare che la riduzione di tali fattori produce la 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.

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.

Recentemente è stata realizzata attraverso la funzione predittiva identificata con la sezione sugli studi longitudinali del Progetto CUORE – epidemiologia e prevenzione delle malattie cardiovascolari, la carta del rischio e il punteggio individuale per la valutazione del rischio cardiovascolare globale assoluto. Questi strumenti sono messi a disposizione dei medici di medicina generale, degli specialisti, dei centri di medicina preventiva, delle sezioni trasfuzionisti e donatori e dei farmacisti per una più appropriata azione di medicina preventiva cardiovascolare 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 del SSN.

Piano triennale

Va reso operativo un progetto dimostrativo, che avvii azioni di prevenzione attiva sulle malattie cardiovascolari in una rilevante fascia della popolazione italiana al fine di affermare un appropriato intervento in coloro che sono ad aumentato rischio di sviluppare una malattia cardiovascolare maggiore nei 10 anni successivi e, più in generale, sviluppare una cultura dello stile di vita salutare nella popolazione.

È disponibile un *software* in grado di far funzionare l'algoritmo di rischio per la popolazione italiana, che costituisce lo strumento essenziale per l'identificazione degli individui ad alto rischio cardiovascolare. È scaricabile attraverso il sito *web* www.cuore.iss.it. Misurando i fattori di rischio con metodologia standardizzata, è possibile valutare il rischio globale assoluto in modo puntuale. Il programma permette anche di archiviare i dati raccolti sui fattori di rischio e del punteggio individuale negli assistiti in modo da valutarne nel tempo la variazione. Il programma, messo a disposizione gratuitamente dall'ISS, prevede l'iscrizione del medico in modo da facilitare la comunicazione per gli aggiornamenti periodici. Attraverso tale programma è possibile raccogliere dati per la valutazione della efficacia reale dello strumento.

Le fasi operative prevedono:

il coinvolgimento di specifici operatori della sanità pubblica, in primo luogo i medici di famiglia

la formazione degli operatori coinvolti nella prevenzione attiva

l'implementazione tra gli operatori coinvolti di procedure *standard* di utilizzo delle misure utili a rendere accurato l'uso delle carte e del punteggio di rischio

l'implementazione delle carte e del punteggio di rischio cardiovascolare attraverso l'installazione del programma informatizzato *cuore.exe* (Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute)

lo sviluppo di un piano di lavoro e strategie per i vari livelli operativi (a livello regionale e/o di livelli istituzionali decentrati)

il monitoraggio dei fattori di rischio cardiovascolare

Obiettivi a lungo termine di tale attività sono:

il cambiamento dello stile di vita tra gli individui ad alto rischio e nella popolazione generale;

l'eliminazione delle disuguaglianze regionali

la riduzione dell'incidenza delle patologie cardiovascolari.

Valutazione dell'uso dei farmaci e delle dinamiche prescrittive nella popolazione generale

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. Questa conoscenza comporta, necessariamente, la disponibilità di fonti di dati routinarie che siano certificate e sistematicamente aggiornate. Ciò consente infatti di studiare l'esposizione ai farmaci nella popolazione generale e di quantificare l'impatto di eventuali rischi derivanti da segnali emergenti nell'ambito dei sistemi di farmacovigilanza. Di non poco rilievo è anche l'aspetto della identificazione di possibili aree di inappropriata d'uso che può essere valutata attraverso idonei studi epidemiologici osservazionali.

In questo contesto 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 di programmazione sanitaria.

Le attività riguardano i seguenti principali settori di intervento:

il controllo di qualità e la certificazione dei Data Base OsMed;

l'identificazione e l'integrazione di nuovi flussi informativi;

lo sviluppo di modelli previsionali sull'andamento dei consumi e della spesa farmaceutica;

la valutazione dell'effetto degli interventi regolatori ;

la redazione dei Rapporti periodici sull'uso dei farmaci in Italia.

Piano triennale

È in corso un programma di collaborazione scientifica con l'Agenzia Italiana del Farmaco, nell'ambito della quale viene svolta, da parte dell'ISS, una attività di supporto tecnico-scientifico relativa allo sviluppo di modelli di analisi e alla organizzazione dei flussi di dati di consumo dei farmaci con la predisposizione di rapporti periodici. Vengono sviluppate, inoltre, attività di supporto al Comitato Tecnico Scientifico (CTS) dell'AIFA che ha assorbito le funzioni in precedenza attribuite alla Commissione Unica del Farmaco (CUF).

Sono in corso anche attività di collaborazione con diverse Regioni per la ottimizzazione dei Sistemi di Monitoraggio delle prescrizioni farmaceutiche sia dal punto di vista della fruibilità dei dati da parte di tutti gli operatori regionali, sia dal punto di vista delle modalità di analisi, sia infine per la produzione di reportistiche periodiche sull'uso dei farmaci secondo un formato *standard*. In questo contesto sono previste iniziative di formazione, sia rivolta agli operatori regionali sulla Farmacovigilanza e sulla *Drug Utilization*, sia rivolta ai medici con iniziative di promozione della appropriatezza d'uso dei farmaci.

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, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha designato, nell'agosto 2001, l'Istituto Superiore di Sanità, sede del *Collaborating Centre for Research and Health Promotion on Alcohol and Alcohol-related Problems*.

Il Centro, organo di consulenza tecnico-scientifica internazionale del WHO di Copenaghen e di Ginevra, è dal 2005 il *Focal Point* nazionale per l'attuazione della *Framework on Alcohol*

Policy for the European Region. Le attività salienti del Centro possono essere sommariamente identificabili nella a) 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); b) 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) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (Alcohol Control Database; <http://data.euro.who.int/alcohol/Default.aspx?TabID=2421>).

Il WHO CC ha la sua articolazione nazionale nell'Osservatorio Nazionale Alcol – OssFAd, osservatorio interdipartimentale tra il CNESPS e il Dipartimento del Farmaco.

Il Centro collabora con la Consulta Nazionale Alcol ai sensi della Legge 125/2001.

Piano triennale

Il piano di lavoro concordato, rinnovato nel 2005 sino al 2008, prevede che il Centro Collaboratore rappresenti il punto di raccordo nazionale ed europeo riguardo le problematiche epidemiologiche e di salute pubblica attraverso la ricerca, la programmazione, l'implementazione e la valutazione dei programmi e delle iniziative preventive e di promozione della salute che possono ridurre il carico di malattia derivante dall'uso e dall'abuso di alcol. L'impegno, in tal senso, è da riferirsi anche alle attività di consulenza, orientamento e diffusione dell'informazione specifica, utile per la programmazione sanitaria e di definizione di obiettivi di salute collegati all'alcol da inserire nell'ambito dei piani sanitari nazionali e regionali attraverso la produzione dell'evidenza epidemiologica e scientifica sul quale basare interventi di valenza europea quali quelli perseguiti dai progetti nazionali, europei e internazionali a cui il Centro collabora. Il Centro è già attivo quale *Focal Point* nazionale per l'attuazione della *Framework on Alcohol Policy for the European Region* ed è l'organo di consulenza internazionale specifico del WHO di Copenaghen e di Ginevra.

Tra le attività salienti del piano di lavoro concordato e approvato a livello governativo vi sono quelle di partecipazione alla produzione delle evidenze scientifiche e alla definizione e disseminazione delle linee guida cliniche per l'integrazione delle attività preventive specifiche nei *setting* socio-sanitari, alla produzione di strategie condivise europee per la riduzione del rischio alcol-correlato (dettagli alle pagine web: www.who.int/substance_abuse/publications/en/italy.pdf; www.phepa.net/units/phepa/html/en/dir360/doc8870.html, <http://www.who-alcohol-phaseiv.net/italy.htm>).

Ulteriore settore di rilievo è il monitoraggio per indicatori garantita attraverso l'attiva rete di collaborazioni che assicurano un *expertise* dedicato ai gruppi formali e informali di lavoro definiti a livello internazionale, europeo e nazionale che garantiscono l'aggiornamento periodico e continuo delle basi di dati informativi nazionali previste dal Sistema Europeo Informativo sull'Alcol (EIAS) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (Alcohol Control Database; <http://data.euro.who.int/alcohol/Default.aspx?TabID=2421>). Il Centro collabora con la Consulta Nazionale Alcol ai sensi della Legge 125/2001.

Il WHO CC ha la sua articolazione nazionale nell'Osservatorio Nazionale Alcol (ONA) – OssFAd.

L'Osservatorio Nazionale Alcol ha ottenuto nel 2005 tramite il Centro WHO il riconoscimento di organismo di riferimento per le attività svolte a livello nazionale e di strumento di consulenza tecnico-scientifica di rilievo internazionale. La coincidenza dei piani di

lavoro dell'ONA-OssFAD e del WHO CC garantirà nel prossimo triennio un attivo contributo alle Relazioni annuali al Parlamento relative alla legge 125/2001, l'elaborazione e pubblicazione sui siti *web* www.iss.it/ofad e www.epicentro.iss.it di aggiornamenti periodici sui dati epidemiologici e sui risultati dei progetti attuati nell'Istituto Superiore di Sanità. Il WHO CC collaborerà allo svolgimento del mandato del Ministero della Salute di attuazione del Telefono Verde Alcol (800 63 2000) e alla organizzazione annuale dell'*Alcohol Prevention Day*. Continuerà inoltre a fornire consulenza tecnico-scientifica al Ministero della Salute, alle Regioni, alle Aziende Sanitarie Locali con cui collabora alla realizzazione di campagne e di iniziative di promozione della salute attraverso i finanziamenti previsti dalla Legge 125/2001.

**Centro Nazionale
per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentare**

Attività di ricerca

Studio della contaminazione da ocratossina A nel vino e suo impatto sanitario su gruppi di popolazione a rischio

Nell'ultimo decennio è stata evidenziata la presenza di ocratossina A (OTA), tossina cancerogena e nefrotossica, nel vino e conseguentemente il Reg. (CE) 123/2005 ha fissato il limite massimo tollerabile di OTA nel vino e in bevande analoghe (2,0 ug/kg). Studi condotti dall'ISS sui vini italiani hanno dimostrato una incidenza superiore nei vini del Sud Italia.

Studi di tossicologia cellulare evidenziano inoltre la possibilità di un diverso comportamento metabolico dell'OTA a parità di dose ingerita in soggetti sani e in consumatori di vino.

Il presente progetto si prefigge quindi di approfondire gli aspetti salienti relativi alla contaminazione sulle uve e quelli relativi all'impatto di questa contaminazione sul consumatore come di seguito riportato:

- isolamento, identificazione e caratterizzazione genetica delle specie fungine responsabili della contaminazione

- determinazione delle specie fungine tossinogene sulle uve in relazione ai fattori ambientali, agronomici e colturali

- studio di metodi diagnostici immunoenzimatici e di biologia molecolare per la ricerca delle micotossine su uve

 - eventuale presenza di altre micotossine nel vino

- studio della tossicità da OTA nel rene senile con particolare riferimento alla fibrosi caratterizzante l'invecchiamento del rene.

- studio di esposizione alla OTA per gli etilisti da vino, tramite i biomarcatori di esposizione, la valutazione dei parametri ematocritici per la funzionalità epatica, renale e pancreatica e di alcuni indicatori neoplastici quali l'alfafetoproteina e il Ca199.

- utilizzo di modelli cellulari intestinali umani per definire i meccanismi di tossicità dell'OTA in cellule bersaglio per la valutazione degli aspetti metabolici

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si prefigge lo scopo di acquisire informazioni sullo stato di contaminazione da ocratossina A in campioni di vino relativi alla produzione nazionale con particolare riferimento al centro-sud. Saranno inoltre investigati vini di produzione europea con particolare riferimento alla produzione francese. I risultati attesi dovranno costituire una base informativa volta alla valutazione dell'esposizione del consumatore italiano a questa micotossina correlata con il consumo di vino.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno trasferibili a:

- produttori del settore vitivinicolo per la prevenzione e la gestione della contaminazione

- operatori del settore clinico per il migliore trattamento preventivo e terapeutico di gruppi di popolazione a rischio

“Qualità microbiologica del pescato e implicazioni sulla salute del consumatore” U.O. nell'ambito del progetto “Valorizzazione del pescato italiano e analisi della sicurezza alimentare attraverso un sistema di caratterizzazione, garanzia di qualità e origine di provenienza basato sull'uso di strumenti bio-tecnologici innovativi”

I prodotti della pesca rappresentano un'importante fonte alimentare in Italia, ma si riscontra ancora una ridotta valorizzazione di tale settore. Obiettivo generale è l'utilizzazione di strumenti bio-tecnologici innovativi per valorizzare il pescato italiano, sviluppando un sistema integrato che sia estensibile alle diverse specie marine di interesse commerciale, a sostegno della qualità

del prodotto e della salute del consumatore. L'acquisizione di dati quali-quantitativi dei microrganismi, facenti parte della *facies* microbica dei prodotti e degli eventuali contaminanti patogeni, riveste una importanza fondamentale per la caratterizzazione igienico-microbiologica e per la valutazione del rischio per il consumatore. Inoltre tali dati potranno anche fornire indicazioni sulla distribuzione ambientale di particolari patogeni quali le spore del *Cl. botulinum*.

Risultati attesi nel triennio

I prodotti primari del progetto comprenderanno metodi e protocolli analitici di caratterizzazione dei prodotti della pesca, che saranno la base per la formulazione di linee guida finalizzate all'individuazione di marchi (di origine e/o di qualità) applicabili ai prodotti della pesca. Gli studi, che verranno condotti subito dopo cattura e durante le prime fasi di lavorazione porteranno alla caratterizzazione della *facies* microbica delle specie ittiche considerate e dei patogeni più frequentemente presenti, al fine di evidenziare i punti critici durante le fasi di lavorazione.

Trasferibilità dei risultati

Le metodiche elaborate saranno rese disponibili per i vari settori del SSN deputati al controllo ufficiale e per il settore della produzione che potrà utilizzarle nell'ambito dell'autocontrollo. I dati relativi ai prodotti forniranno indicazioni per la loro caratterizzazione microbiologica nonché sulla distribuzione di alcuni patogeni ambientali.

“Creazione di una banca dati nazionale di profili molecolari di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da campioni alimentari, ambientali e clinici e trasferimento dei dati al Pulsenet europeo per una sorveglianza epidemiologica della listeriosi a livello nazionale e comunitario

Fin dal 1998 varie Decisioni e Regolamenti emanati dalla Comunità Europea hanno puntualizzato l'importanza di istituire reti di sorveglianza epidemiologica e di controllo delle malattie trasmissibili nella Comunità, con lo scopo di promuovere la cooperazione e il coordinamento tra gli stati membri, al fine di migliorare la prevenzione e il controllo nella comunità delle malattie trasmissibili, fra le quali le malattie di origine alimentare.

Le reti comunitarie verranno utilizzate per la sorveglianza epidemiologica delle malattie trasmissibili e per un sistema di allarme rapido e di reazione per la prevenzione e il controllo delle stesse malattie.

Dal 1993 il CNQARA opera come centro di referenza per la *Listeria monocytogenes*, provvedendo alla tipizzazione biochimica e sierologica e alla valutazione della patogenicità dei ceppi di *Listeria monocytogenes* alimentari, ambientali e clinici inviati dalle strutture del SSN.

L'obiettivo dell'attività di ricerca è di avviare un programma di caratterizzazione molecolare di ceppi di *Listeria monocytogenes*, allo scopo di identificare i pulsotipi prevalenti presenti nel territorio italiano e confrontarli con quelli presenti nella comunità mediante il trasferimento dei dati al *network* europeo Pulsenet

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Listeria monocytogenes* mediante PFGE.

Raccolta dei profili PFGE e loro codifica mediante Bio-Numerics.

Realizzazione di un *database* elettronico con libero accesso, da utilizzare nelle indagini epidemiologiche sugli episodi di listeriosi, verificatisi in Italia.

Trasferimento dei profili PFGE al Pulsenet europeo, organizzato sul modello di quello attivo negli USA, per la sorveglianza epidemiologica della listeriosi nella Comunità.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento dei dati al *network* europeo Pulsenet per la sorveglianza epidemiologica della listeriosi nella Comunità

“Ricerca per la riduzione della contaminazione da aflatossine; filiera mais-prodotti lattiero caseari (AFLARID)”

L'obiettivo generale del progetto è di mettere a punto un Sistema di Supporto alle Decisioni (SSD) per gestire la filiera maidicola/lattiero casearia, con lo scopo di minimizzare il contenuto di aflatossine. Il progetto prenderà in considerazione le differenti fasi della filiera: dalla scelta varietale all'effetto dei processi di caseificazione e stagionatura. L'obiettivo specifico della linea di ricerca è a) definire un piano metodologico completo per la determinazione dell'AFB1 nel mais e dell'AFM1 nel latte e prodotti derivati b) studiare l'influenza del processo tecnologico per la filiera mais e prodotti derivati al fine di individuare i punti critici che portano a livelli inaccettabili nel settore mangimistico c) studiare le modifiche dell'AFM1 nella filiera latte-formaggi.

Risultati attesi nel triennio

Definizione e implementazione di un piano di campionamento *ad hoc* per la valutazione della distribuzione della aflatossina B1 (AFB1) in campi coltivati a mais.

Messa a punto e organizzazione di uno studio di validazione per la determinazione della aflatossina B1 in campioni di granella di mais.

Validazione di un metodo di analisi per ELISA e HPLC per la determinazione della Aflatossina M1 nel formaggio.

Definizione di linee guida finalizzate alla individuazione dei punti critici di controllo della filiera maidicola in relazione alla utilizzazione del mais nel settore mangimistico

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di un metodo di analisi per la determinazione della aflatossina B1 nel mais e prodotti derivati. Lo strumento diagnostico sarà distribuito alle strutture operative del SSN per l'espletamento delle attività del controllo ufficiale degli alimenti

Definizione di un piano di campionamento in campo per la valutazione della distribuzione della aflatossina B1. Questo strumento fornirà al settore produttivo primario un mezzo per poter predire lo stato di contaminazione da aflatossina durante le fasi di maturazione del mais con ripercussioni sulla destinazione d'uso del prodotto stesso dopo la raccolta.

Acilammide e furano negli alimenti: Presenza in alimenti tipici italiani, studi di biodisponibilità in modelli sperimentali animali e valutazione dell'esposizione della popolazione italiana tramite monitoraggio alimentare e biologico

La neoformazione di acilammide e furano negli alimenti in seguito a processo (cottura e conservazione) è stata evidenziata per la prima volta per i due composti, rispettivamente nel 2002 e nel 2004. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro classifica l'acilammide nel gruppo 2A (probabile cancerogeno per l'uomo) e il furano nel gruppo 2B (possibile cancerogeno per l'uomo). Non è ancora chiaro se tali sostanze possano porre un rischio cancerogeno per l'uomo, in particolare quando assunti attraverso la dieta.

Si propone di misurare i livelli di acilammide e di furano neoformati in seguito a processo in vari alimenti tipici italiani.

L'esposizione della popolazione italiana ai due composti sarà stimata misurando tramite monitoraggio alimentare (dati analitici e di assunzioni alimentari) e biologico (biomarcatori). Saranno comparati i livelli di esposizione in diverse Regioni italiane e in diverse fasce di popolazione in relazione a questionari relativi alla dieta dei singoli individui.

Studi di biodisponibilità (per acrilammide e furano) comparata tra l'assunzione attraverso un determinato alimento e l'acqua da bere (via di somministrazione utilizzata in studi tossicologici) saranno condotti in suini, specie animali dotate di sistema cardiocircolatorio e digerente molto simili a quello umano. Alcuni animali verranno alimentati con diete *standard* addizionate con alimenti ad elevato contenuto di acrilammide o furano (precedentemente analizzati per la determinazione delle due sostanze); altri con diete *standard* e acqua da bere contenente acrilammide o furano. La biodisponibilità dei due composti sarà valutata per alimenti contenenti acrilammide e/o furano e per diverse concentrazioni dei due contaminanti.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di metodi validati per la determinazione e la quantificazione di acrilammide e furano in vari alimenti tipici italiani (pizza, prodotti da forno, preparazioni casalinghe, conserve, alimenti destinati all'infanzia, ecc.) tramite estrazione dalla matrice alimentare seguita da analisi in LC/MS/MS (acrilammide) o GC/MS (furano).

Determinazione dei livelli di acrilammide e furano nelle matrici alimentari suddette.

Stima dell'esposizione media della popolazione italiana ad acrilammide e furano attraverso la dieta, in relazione ad abitudini alimentari correlate a residenza geografica, età, stili di vita, ecc. Particolare attenzione sarà rivolta alle fasce di popolazione (bambini e adolescenti) più suscettibili per tipo di alimentazione (patatine, *snack*, biscotti, prodotti da forno, conserve, ecc.). L'esposizione sarà stimata tramite: a) monitoraggio biologico, misurando biomarcatori di esposizione per l'acrilammide (addotti all'emoglobina) e per il furano (furano nel siero); b) monitoraggio alimentare, in base ai dati ottenuti dall'analisi degli alimenti tipici italiani, ai dati di letteratura e ai livelli di assunzione media giornaliera degli alimenti considerati.

Valutazione della biodisponibilità di acrilammide e di furano assunti attraverso diversi alimenti in un opportuno modello sperimentale animale (suino). Sarà stimata la biodisponibilità comparata nel suino tra l'assunzione attraverso un determinato alimento e attraverso l'acqua da bere di acrilammide e di furano.

Trasferibilità dei risultati

I metodi analitici per la determinazione di acrilammide e furano in vari alimenti saranno validati e quindi divulgati ai laboratori periferici nazionali (ASL, IZS, ecc.), quale strumento utile per il controllo ufficiale degli alimenti per quanto riguarda la presenza di contaminanti chimici da processo.

I risultati ottenuti dalla stima dell'esposizione della popolazione italiana ai due composti tossici forniranno la base per: a) studi di riduzione della neoformazione di acrilammide e/o di furano in determinati alimenti tramite opportuna modifica dei processi produttivi; b) valutazione dell'opportunità di fornire raccomandazioni alimentari legate al rischio di assunzione di acrilammide e furano, con particolare attenzione alle fasce di popolazione più suscettibili (bambini, donne in gravidanza e allattamento, anziani, ecc.)

I risultati ottenuti dagli studi di biodisponibilità forniranno la base per una più adeguata valutazione del rischio da acrilammide e furano assunti attraverso la dieta.

Analisi del fattore di virulenza internalina nei ceppi clinici e alimentari di *Listeria monocytogenes* isolati in Italia

Il patogeno alimentare *Listeria monocytogenes* ha la capacità di attraversare la barriera intestinale, placentare ed emato-encefalica dell'organismo umano, causando rispettivamente gastro-enterite, infezioni materno-fetali e meningoencefalite. L'internalizzazione di *L. monocytogenes* nelle cellule ospiti è mediata da proteine che sono presenti sulla sua superficie batterica, tra le quali l'internalina è quella meglio caratterizzata. A causa di mutazioni puntiformi nel gene che codifica l'internalina, alcuni ceppi di *L. monocytogenes* producono

forme troncate di questa proteina, le quali sono inattive. I ceppi che producono internalina troncata non sono in grado di invadere le cellule epiteliali (tra le quali l'endotelio gastroenterico), e risultano pertanto meno virulenti o del tutto avirulenti. Un recente studio realizzato in Francia ha evidenziato che i ceppi produttori di internalina troncata sono più spesso isolati da portatori asintomatici o da pazienti affetti da batteriemia, più che da listeriosi invasiva vera e propria; nello stesso lavoro, è stata dimostrata una correlazione tra internalina troncata e sierotipo dei ceppi di *L. monocytogenes*.

La prevalenza e la distribuzione dei ceppi produttori d'internalina troncata in Italia sono al momento ignote. Scopo del progetto sarà quello di analizzare le forme d'internalina prodotte dai ceppi clinici e alimentari di *L. monocytogenes*, mediante SDS-PAGE e *Western blotting*, sequenziamento del gene per l'internalina nel caso dell'identificazione di forme troncate, e studio dell'invasività in cellule epiteliali in coltura.

Risultati attesi nel triennio

Ci si attende che una certa percentuale di ceppi di *L. monocytogenes* analizzati esprima internalina troncata. La causa della produzione d'internalina troncata sarà individuata mediante sequenziamento del gene corrispondente; l'effettiva inabilità dei ceppi che esprimono internalina troncata a invadere gli epiteli sarà confermata mediante studi su colture cellulari.

Verranno stabilite le correlazioni esistenti tra i polimorfismi nell'internalina e le diverse manifestazioni cliniche della listeriosi. A questo scopo saranno specificamente paragonate le forme d'internalina prodotte dai ceppi clinici di *L. monocytogenes* isolati da listeriosi classica, listeriosi gastroenterica (una forma emergente di listeriosi che differisce dalla forma classica in termini di spettro clinico, popolazione *target*, dose infettiva e tempo medio d'incubazione), e da portatori asintomatici. I dati sulla prevalenza dei ceppi produttori d'internalina troncata negli alimenti consentiranno di definire la mappa della loro distribuzione geografica e per tipologia di prodotto.

L'espressione dell'internalina è in stretta relazione con la valutazione del potenziale patogeno dei ceppi di *L. monocytogenes* e, in ultima analisi, rappresenta un *marker* per la valutazione del rischio associato al consumo di prodotti alimentari contaminati con questo patogeno. Poiché esiste un'ampia variabilità nel potenziale patogeno dei diversi ceppi di *L. monocytogenes*, è stato proposto che tale rischio non sia solo valutato sulla base dei livelli di contaminazione batterica, ma anche su altre caratteristiche del patogeno, quali, appunto, il suo potenziale patogeno.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio della funzionalità dell'internalina (intera o troncata) prodotta dai ceppi di *L. monocytogenes* che contaminano un alimento potrà contribuire a una migliore caratterizzazione del pericolo microbiologico, fase chiave ai fini di una valutazione del rischio più razionale. I risultati ottenuti sull'internalina di *Listeria* potranno perciò essere utilizzati da tutte le strutture coinvolte nell'elaborazione della valutazione del rischio microbiologico di un alimento, cioè i laboratori periferici del SSN, gli Istituti Zooprofilattici, l'ISS e il Ministero della Salute. Tali dati saranno in ultima analisi utili alla messa a punto, in accordo con le aziende di produzione e trasformazione alimentare, di misure preventive di controllo più efficienti ed economiche per l'assicurazione della qualità igienica e sicurezza d'uso degli alimenti.

Analisi del rischio e obiettivi di sicurezza alimentare in relazione ai pericoli microbiologici: approfondimenti e metodiche applicative

Sono ormai diversi anni che l'Analisi del Rischio è stata riconosciuta come una procedura utile se non indispensabile per fornire indicazioni, anche quantitative, su come contenere i rischi dovuti al consumo di alimenti contaminati dal punto di vista microbiologico. L'analisi del

rischio dovrebbe consentire di produrre ed elaborare i dati per l'individuazione del pericolo massimo tollerabile al termine della filiera (Obiettivo di sicurezza alimentare=FSO) con l'intento finale di fornire al consumatore un appropriato livello di protezione "al momento del consumo".

Il progetto si propone la diffusione e l'omogeneizzazione di conoscenze e approcci specifici tra gli addetti al conseguimento dei predetti obiettivi, inclusa la proposta di modellistiche applicative, che verranno realizzate anche mediante l'esame e la comparazione delle esperienze già conseguite nel settore.

Il progetto verrà condotto in collaborazione con alcune Università e strutture del Servizio Sanitario Nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Costituzione di un *network* di riferimento nazionale per l'analisi del rischio applicata alla microbiologia degli alimenti.

Metodiche per pervenire alla definizione pratica di obiettivi di sicurezza alimentare per alcune tipologie alimentari e per specifici pericoli microbiologici.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di dati e modelli ai fini dell'individuazione di obiettivi di sicurezza alimentare da parte del Servizio Sanitario Nazionale.

Antibiotico resistenza in ceppi di interesse alimentare (*Listeria monocytogenes*, lattobacilli, *vibrio spp*)

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza rappresenta una delle problematiche più attuali e serie per la salute pubblica. WHO, FAO, OIE, *Codex* e altri organismi internazionali raccomandano il contenimento della antibiotico resistenza da uso non umano di antibiotici da realizzare principalmente attraverso il monitoraggio e la sorveglianza della antibiotico resistenza dei patogeni zoonotici. L'uso dei chemioantibiotici negli allevamenti degli animali da reddito, è considerato il fattore principale per l'insorgenza di ceppi antibioticoresistenti; ceppi antibiotico resistenti possono fungere da "serbatoi" di geni di antibiotico resistenza" trasferibili a livello intestinale anche a microrganismi appartenenti a generi differenti amplificando quindi il rischio delle patologie non trattabili con gli antibiotici in questione o con quelli a resistenza crociata. Si propone di continuare il monitoraggio sulla antibiotico resistenza in ceppi di *Listeria monocytogenes* nei confronti delle principali molecole di impiego clinico e veterinario. Tale studio è il prosieguo di un programma più ampio di sorveglianza dell'antibiotico resistenza per *Listeria* avviato dall'Istituto Superiore di Sanità nel 1995 per valutare eventuali fluttuazioni di tale fenomeno nel tempo. Si intende inoltre ottenere dati dell'incidenza di antibiotico resistenza in ceppi di lattobacilli e starters isolati da alimenti, e *vibrio* provenienti dalla collezione dell'LRN per i molluschi.

Risultati attesi nel triennio

Dati sulla prevalenza e incidenza dei principali determinanti di antibiotico resistenza in alcuni ceppi microbici di interesse alimentare. Acquisizione di dati sul *trend* di tale fenomeno e trasferimento delle resistenze dai ceppi di provenienza animale a ceppi normalmente presenti nella flora batterica

Trasferibilità dei risultati

Sorveglianza sull'insorgenza di ceppi con antibiotico resistenze nuove o nuove combinazioni. Emissione di linee guida per un più corretto e prudente uso degli antibiotici in veterinaria e suggerimenti circa l'uso di metodi alternativi per il miglioramento dello stato di

salute degli animali (es: uso di vaccini, cambiamenti nelle tecniche di stabulazione, somministrazione di probiotici, ecc.)

Attività di formazione teorico-pratica destinata a studenti delle scuole medie superiori relativamente alla filiera del latte

Il latte è presente nella nostra dieta quotidiana ed è consumato anche da fasce di popolazione vulnerabili (bambini, gestanti, nutrici, anziani). Tuttavia, il ripetersi di episodi gravissimi per la qualità e la sicurezza in questo settore, ha minato pesantemente la fiducia dei consumatori, aumentando ulteriormente la confusione e la perplessità riguardo le tecnologie di produzione, la qualità del prodotto finito oltre che ai controlli che vengono eseguiti. Questo ha minimizzato la comprensione e l'apprezzamento di quanto viene fatto per garantire la sicurezza del consumatore.

Il latte è il settore che più di ogni altro richiede rapidità e precisione nei controlli che vengono effettuati all'ingresso negli impianti di lavorazione, attenzione ai contaminanti chimici e microbiologici, efficacia nel confezionamento, rapidità di consegna. A seguire, le tecniche di caseificazione rappresentano un altro settore estremamente diversificato dove la qualità del prodotto finito è strettamente condizionata dalla corretta conoscenza delle diverse tecnologie. Il progetto, in linea con attività simili sviluppate da altre strutture dell'ISS in collaborazione e con il supporto del MIUR, si propone di definire strategie per favorire la diffusione dell'informazione sulle principali problematiche chimico-microbiologiche del latte e dei prodotti lattiero caseari, metodologie analitiche e loro finalità e su processi di lavorazione di prodotti industriali tipici e tradizionali attraverso brevi corsi teorico pratici.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di rappresentare un primo passo per una campagna di informazione sulla filiera di questo prodotto che attualmente è presentato nei punti vendita in forme e tipi estremamente diversificati (latte a diverse *shelf-life*, latte aromatizzati, latte a diversi tenori di grasso, latte addizionati con omega-3, latte presentati in diversi confezionamenti, ecc.).

Trasferibilità dei risultati

Contribuire alla promozione della cultura tecnico scientifica nelle scuole medie superiori coinvolgendo insegnanti e studenti in iniziative che valorizzino la relazione tra il mondo della scuola e quello del controllo, della produzione e della ricerca. I partecipanti dovranno poi svolgere in seno alle loro stesse famiglie e scuole azioni di informazione. Una migliore conoscenza di quanto viene fatto può contribuire significativamente a ridare fiducia al consumatore per un prodotto che oggi rappresenta una fetta importantissima del nostro mercato economico e a promuovere consumi consapevoli attuando quindi in pieno una delle missioni del CNQARA.

Attività istituzionale del LRN in materia di analisi e di prove sul latte e sui prodotti a base di latte

Allestimento di *proficiency-test*, coinvolgendo i laboratori implicati nel controllo ufficiale del territorio nazionale, per la definizione di alcuni parametri microbiologici e/o chimici. Allestimento di prove comparative relativamente alla validazione di nuovi metodi di analisi. *Stage* per personale dei laboratori del controllo ufficiale relativamente alle metodiche utilizzate nel controllo del latte. Attività di supporto ai laboratori ufficiali relativamente all'applicazione di metodi del latte. Revisioni di analisi relativamente ad alcuni parametri del latte. Attività di coordinamento con il LRC per il latte di Maisons-Alfort e partecipazione a tutte le attività dei suddetti LRC (*Workshop, proficiency test, comparative trial, stage, meeting, draft and report*)

Caratterizzazione di ceppi microbici ai fini di una valutazione del rischio correlato alla loro presenza negli alimenti e nell'ambiente

La caratterizzazione di ceppi microbici mirata alla individuazione di parti del genoma deputate alla patogenicità di un ceppo e/o la subtipizzazione per la determinazione di relazioni genotipiche tra ceppi diversi sono alla base di una tempestiva e corretta individuazione del rischio correlato alla presenza del germe nell'alimento o nell'ambiente. Tra le tecniche conosciute la PFGE rappresenta la metodica maggiormente discriminante.

In questo ambito si intende tipizzare i circa 400 ceppi di *C. botulinum* isolati presso il Centro Nazionale di Riferimento per il botulismo in occasione di episodi di botulismo alimentare e infettivo in Italia. Parallelamente verranno sviluppati e applicati metodi per caratterizzazione e la verifica del significato epidemiologico di vibriani isolati da prodotti della pesca nell'ambito delle attività di sorveglianza condotte dal LNR.

Risultati attesi nel triennio

- Determinazione dei profili molecolari dei ceppi testati
- Studio della distribuzione ambientale dei vari pulsotipi identificati
- Correlazione degli isolati nello studio di episodi di botulismo
- Correlazione degli isolati nello studio di episodi di gastroenteriti correlate a vibriani patogeni

Trasferibilità dei risultati

I profili ottenuti possono essere messi a disposizione per la realizzazione di banche dati internazionali, come avviene attualmente nell'ambito del PulseNet per i ceppi di *L.monocytogenes*, *Salmonella spp*, *C. jejuni*, *E. coli* O157.

Tale banca dati internazionale potrebbe essere un utile strumento per l'individuazione delle fonti di intossicazione botulinica o di altri microrganismi in occasione di episodi internazionali.

Caratterizzazione e bioaccessibilità di elementi essenziali in prodotti funzionali a base di latte

Il latte e i prodotti lattiero-caseari rivestono notevole importanza quali fonti di nutrienti minerali e modulatori del loro assorbimento a livello gastro-intestinale. Tali alimenti forniscono una parte significativa del fabbisogno in calcio, zinco, selenio e influenzano l'assorbimento di altri elementi essenziali come il ferro. L'insufficiente apporto di tali nutrienti attraverso la dieta determina manifestazioni carenziali con gravi effetti sulla salute, che si possono riscontrare in misura più o meno estesa anche in gruppi della popolazione italiana.

Molti elementi minerali sono associati nel latte ai caseinofosfopeptidi (CPP), mentre microelementi come il selenio sono verosimilmente incorporati nelle proteine, ad esempio come selenometionina o selenocisteina. Le proteine del latte sono di particolare interesse in quanto contengono alcune sequenze aminoacidiche associate a effetti biologici positivi ('peptidi bioattivi'), inclusa la modulazione del trasporto e dell'assorbimento di minerali. Tali effetti benefici si manifestano solo quando i peptidi vengono liberati mediante idrolisi enzimatica nel tratto gastrointestinale. I peptidi bioattivi, fra i quali i CPP, possono essere rilasciati mediante proteolisi enzimatica (*in vitro*) o tramite l'azione dei batteri lattici usati nella produzione di alimenti fermentati (*in vivo*).

Lo scopo del progetto è la caratterizzazione dei minerali essenziali associati ai peptidi bioattivi del latte, la valutazione della loro bioaccessibilità e dei fattori che la influenzano, l'utilizzo delle conoscenze acquisite per la messa a punto di alimenti in grado di promuovere l'assorbimento di tali nutrienti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di accertare in che misura i peptidi bioattivi ottenibili mediante idrolisi enzimatica delle proteine del latte sono in grado di aumentare la bioaccessibilità di elementi essenziali quali calcio, zinco, selenio e ferro, e di utilizzare le conoscenze acquisite per la messa a punto di prodotti con caratteristiche funzionali (aumento del valore nutritivo in minerali). Il fine è di promuovere lo stato di buona salute della popolazione e aumentare il grado di protezione dalle patologie degenerative mediante il consumo di alimenti innovativi, che uniscono alla loro qualità e genuinità particolari proprietà nutrizionali.

In termini operativi, questo obiettivo generale comporterà l'identificazione di batteri dell'acido lattico e/o di enzimi specifici che consentano la produzione di peptidi in grado di aumentare l'assorbimento di minerali, la loro caratterizzazione e l'accertamento della loro stabilità attraverso i processi tecnologici di produzione, la stima dell'incremento in termini di bioaccessibilità (*in vitro*) per una valutazione quantitativa dell'effetto benefico raggiunto.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto include la partecipazione di un *partner* con specifica competenza nel settore delle tecnologie lattiero-casearie e di un partner industriale per la messa a punto di nuovi metodi di produzione. Questi verranno testati mediante impianti pilota e quindi ne verrà verificata l'applicabilità su scala industriale.

Caratterizzazione e quantificazione dei fitoestrogeni negli integratori alimentari e nelle formule per lattanti

I fitoestrogeni sono composti biologicamente attivi di origine vegetale in grado di mimare e modulare l'azione degli estrogeni endogeni umani. Dati epidemiologici e sperimentali suggeriscono che diete ricche in fitoestrogeni possono esercitare effetti protettivi nelle malattie cardiovascolari, nell'osteoporosi, nell'ipercolesterolemia, nella menopausa e nelle neoplasie. Tuttavia molto spesso i supposti benefici rimangono incerti a causa della mancanza di standardizzazione delle metodologie di studio; inoltre, in alcuni casi, in relazione a una elevata assunzione di fitoestrogeni, è stato ipotizzato un aumento del rischio di tumori della mammella e l'insorgenza di effetti avversi sulla fertilità e nei soggetti affetti da ipotiroidismo.

Nel nostro paese i soggetti maggiormente esposti all'assunzione di fitoestrogeni sono i consumatori di alimenti a base di soia, di integratori alimentari costituiti da estratti di soia e di particolari tipi di piante e i lattanti alimentati con formule a base di soia.

I dati relativi al contenuto dei diversi fitoestrogeni negli alimenti sono scarsi, lacunosi e solitamente limitati agli isoflavoni presenti in maggiore quantità nella soia.

Scopo di questo studio è quello di quantificare mediante tecniche affidabili e sensibili, i diversi fitoestrogeni presenti negli integratori alimentari e nelle formule per lattanti per valutare il rischio-beneficio associato all'assunzione di queste sostanze e per meglio comprendere il loro ruolo per la salute umana.

Risultati attesi nel triennio

Dopo aver individuato le metodiche analitiche più idonee alla identificazione e alla quantificazione dei fitoestrogeni, verranno acquisiti i dati di composizione relativi:

agli integratori alimentari a base di soia e di altre piante contenenti fitoestrogeni;

alle formule per lattanti a base di proteine sia di soia che di latte vaccino in considerazione del possibile passaggio nel latte di fitoestrogeni assunti dal bestiame attraverso foraggi e mangimi.

I dati ottenuti potranno essere utilizzati per implementare anche dati relative al contenuto in fitoestrogeni degli alimenti che possono essere impiegate, insieme ai dati di consumo, per la valutazione dell'esposizione di gruppi di popolazione a tali sostanze.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni relative alla caratterizzazione e alla quantificazione dei fitoestrogeni nelle formule per lattanti e negli integratori alimentari potranno essere trasferite e condivise con la comunità scientifica e con le autorità sanitarie al fine di poter:

effettuare una corretta valutazione del rischio-beneficio associato all'assunzione di queste sostanze a tutela e promozione della salute umana, in particolare riguardo ad alcune categorie di soggetti a rischio quali i lattanti;

fornire in modo più preciso dati relativi all'assunzione dei diversi fitoestrogeni, attraverso gli integratori dietetici, per una migliore comparabilità dei risultati ottenuti nei *trial* clinici condotti allo scopo di valutarne l'effettiva efficacia.

Caratterizzazione fenotipica, genotipica e probiotica di ceppi di batteri lattici, ad attività probiotica, isolati da campioni di integratori alimentari

Allo scopo di caratterizzare i batteri lattici, con attività probiotica, contenuti in diverse tipologie di integratori alimentari presenti in commercio, è necessario, oltre allo studio del profilo enzimatico e fermentativo dei carboidrati, procedere alla identificazione a livello di specie e di ceppo dei batteri isolati. L'identificazione a livello di ceppo è indispensabile in quanto è ormai dimostrato che l'attività probiotica è ceppo specifica. Inoltre, l'identificazione del ceppo è importante per correlare un determinato ceppo batterico a uno specifico effetto sulla salute; nonché negli studi epidemiologici e di sorveglianza. Infine, dato che un ceppo batterico per essere definito probiotico deve essere in grado di sopravvivere al passaggio attraverso il tratto digerente, resistendo, quindi a valori bassi di pH, al succo gastrico e alla bile e proliferare nell'intestino, è necessario valutare queste proprietà con opportune prove condotte *in vitro* e *in vivo*.

I campioni oggetto dello studio sono analizzati in diverse fasi della *shelf-life*: dalla produzione alla distribuzione, fino alla data di scadenza.

Risultati attesi nel triennio

Numerazione dei ceppi batterici dichiarati in etichetta.

Studio del profilo enzimatico e fermentativo dei carboidrati mediante l'utilizzo di sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica.

Identificazione a livello di specie mediante ARDRA-PCR (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

Identificazione a livello di ceppo mediante PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Determinazione dell'attività probiotica dei ceppi isolati mediante prove condotte a dimostrare la resistenza ai sali biliari, a bassi valori di pH, al succo gastrico con l'utilizzo di *test in vitro*; nonché l'adesività alle cellule dell'epitelio intestinale con *test* su colture cellulari in monostrato (cellule CACO2).

Determinazione dell'antibiotico resistenza.

Trasferibilità dei risultati

Monitorare la produzione nazionale per definire la qualità degli integratori a base di batteri lattici.

Seguire ogni prodotto in varie fasi della vita "di scaffale" per costruire una curva di decadimento del numero dei microrganismi in funzione del tempo di vita della integratore stesso.

Verificare la stabilità commerciale delle preparazioni a base di probiotici.

Effettuare una sorveglianza post-produzione.

Definizione e documentazione delle caratteristiche di sicurezza alimentare di prodotti tipici e tradizionali italiani

Il progetto intende definire per 40 prodotti tradizionali le specifiche di prodotto inerenti i criteri di identità, di qualità e, in riferimento a questi, quelli di sicurezza alimentare contribuendo a colmare la lacuna che coinvolge l'intero firmamento dei prodotti tradizionali. In particolare, sulla base delle analisi microbiologiche e merceologiche condotte su un pannello di lotti e stabilimenti, per ciascun prodotto si vogliono determinare i seguenti aspetti: a) i termini di variabilità dei processi; b) il valore merceologico nutrizionale del prodotto e delle sue eventuali varianti; c) l'esistenza di popolazioni microbiologiche caratteristiche; d) l'esistenza di andamenti di popolazione entro ambiti accettabili, qualificabili come standard di processo e prodotto; e) la valutazione e la quantificazione dei pericoli di natura chimica e soprattutto microbiologica; f) il comportamento dei patogeni sulla base di modelli predittivi e in campioni sperimentali contaminati; g) il comportamento delle flore microbiche di contaminazione ambientale; h) ingresso, permanenza e diffusione dei patogeni negli ambienti di trasformazione.

Risultati attesi nel triennio

Definizione dell'identità di ciascun prodotto, comprensiva della qualità e dei valori nutritivi; identificazione dei valori di variabilità di processo e di prodotto accettabili, e in particolare in riferimento a questi, la valutazione dei rischi e il comportamento dei microrganismi patogeni e di contaminazione in corso di processo, commercializzazione e consumo.

Trasferibilità dei risultati

L'insieme delle conoscenze derivanti dalla ricerca, renderanno disponibili per ciascuno dei 40 prodotti considerati informazioni differenziate ad operatoricommerciali, consumatori e operatori del SSN su qualità e sicurezza dei prodotti. In particolare verranno rese direttamente disponibili ai consumatori elementi atti a valutare l'identità del prodotto, la qualità, i valori nutritivi, le precauzioni, le peculiarità del prodotto di ciascun singolo produttore rispetto alla variabilità accettata, gli elementi definiti di tracciabilità ambientale o microbiologica; ai produttori, invece, elementi relativi alla variabilità accettata di processo e di prodotto, agli standard di processo o di prodotto; agli operatori del SSN infine la definizione delle caratteristiche di prodotto e di processo, i valori di accettabilità degli standard di processo e di prodotto in relazione al corretto svolgimento dei processi e alle procedure di autocontrollo

Determinazione del livello di acidi grassi poliinsaturi nell'ambito della sorveglianza nutrizionale in stati patologici e non

La popolazione pediatrica risulta, negli ultimi anni soggetta a patologie che possono essere ricondotte e/o influenzate dal regime nutrizionale. In questo contesto risulta indispensabile potenziare l'utilizzo di indicatori al fine di monitorare lo stato di salute dei soggetti interessati e di adeguarne il regime alimentare. Sono stati individuati alcuni acidi grassi poliinsaturi apportati con la dieta che avendo un ruolo fondamentale nei processi metabolici risultano utili a evidenziare eventuali squilibri o carenze determinate da ridotto apporto con la dieta o da aumentato fabbisogno.

Risultati attesi nel triennio

Livelli di riferimento degli acidi grassi in condizioni fisiologiche e patologiche

Trasferibilità dei risultati

Utilizzo dal punto di vista clinico dei livelli individuati ed eventuale riflesso sotto il profilo dell'adeguamento del regime dietetico e di eventuali integrazioni alimentari

Determinazione di elementi nell'ambito della sorveglianza nutrizionale in stati patologici e non

La popolazione pediatrica risulta, negli ultimi anni soggetta a patologie che possono essere ricondotte e/o influenzate dal regime nutrizionale. In questo contesto risulta indispensabile potenziare l'utilizzo di indicatori al fine di monitorare lo stato di salute dei soggetti interessati e di adeguarne il regime alimentare. Sono stati individuati alcuni elementi di interesse bionutrizionale apportati con la dieta che avendo un ruolo fondamentale nei processi metabolici risultano utili a evidenziare eventuali squilibri o carenze determinate da ridotto apporto con la dieta o da aumentato fabbisogno

Risultati attesi nel triennio

Livelli di riferimento degli elementi in condizioni fisiologiche e patologiche

Trasferibilità dei risultati

Utilizzo dal punto di vista clinico dei livelli individuati ed eventuale riflesso sotto il profilo dell'adeguamento del regime dietetico e di eventuali integrazioni alimentari

Distribuzione dei marker genetici epidemici fra i ceppi di *Listeria monocytogenes* di sierotipo 4b

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi umana, una seria infezione alimentare che colpisce individui suscettibili, in particolare le donne in gravidanza, i neonati, gli anziani e le persone immuno-compromesse; può anche causare gastro-enterite febbrile in adulti sani.

Dei 13 diversi sierotipi distinguibili all'interno della specie batterica, il sierotipo 4b è il principale responsabile dei casi epidemici e sporadici di listeriosi umana, in Italia e nel mondo. Queste osservazioni sembrano indicare che il sierotipo 4b di *L. monocytogenes* possiede un potenziale patogeno e/o una capacità di adattamento all'organismo umano più elevati rispetto ad altri sierotipi. È stato recentemente dimostrato che i ceppi 4b implicati in episodi epidemici di listeriosi posseggono nel loro genoma marker specifici: a seconda dei marker genetici, tali ceppi sono stati suddivisi in 2 diversi "cloni epidemici", ECI and ECII. La presenza di marker epidemici si correla bene con i profili molecolari ottenuti mediante la tecnica della PFGE. È ipotizzabile che tali diversità genetiche possano conferire vantaggi selettivi ai ceppi associati ai casi epidemici.

Scopo del progetto sarà quello di studiare la distribuzione dei marker genetici epidemici nei ceppi di *L. monocytogenes* 4b isolati in Italia e in altre parti del mondo, al fine di valutare la loro prevalenza nei campioni clinici, alimentari e ambientali. I ceppi saranno inoltre subtipizzati mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE), al fine di analizzare la loro correlazione genetica e epidemiologica.

Risultati attesi nel triennio

Un metodo genetico-molecolare per identificare i markers dei cloni epidemici I e II verrà messo a punto utilizzando ceppi di *L. monocytogenes* 4b rappresentativi di tali cloni, il cui genoma è stato completamente sequenziato, e che sono disponibili nella collezione del Reparto Pericoli Microbiologici del CNQARA. Il metodo sarà quindi applicato alla collezione dei ceppi, al fine di valutare in quale gruppo (clinici, alimentari, o ambientali) i marker siano più frequenti: una maggiore percentuale fra i ceppi clinici indicherà che i marker conferiscono effettivamente un più elevato potenziale patogeno, mentre una percentuale maggiore fra i ceppi alimentari indicherà che i marker non sono specificamente correlati al potenziale patogeno dei ceppi. È attesa la presenza dei marker epidemici anche nei ceppi ambientali, poiché è stato riportato che essi conferiscono una certa persistenza ambientale.

La subtipizzazione mediante PFGE indicherà il grado di correlazione genetica esistente fra i ceppi: i profili saranno anche paragonati con quelli dei ceppi di riferimento, rappresentativi dei cloni, al fine di stabilire se i *marker* siano associati specificamente ai due peculiari pulsotipi.

Fino a tempi recenti, tutti i ceppi di *L. monocytogenes* sono stati considerati ugualmente patogeni per l'uomo nella valutazione del rischio, in assenza di relazioni certe fra le caratteristiche genetiche dei ceppi e la loro virulenza per l'uomo. Il riconoscimento che la maggior parte degli episodi epidemici a livello mondiale sia stato causato da soli due gruppi di ceppi, ciascuno caratterizzato da uno specifico profilo PFGE e da alcuni *marker* genetici unici, sembra invece indicare che alcuni ceppi rappresentano un rischio maggiore rispetto ad altri.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione di *L. monocytogenes* ai fini di una razionale valutazione del rischio microbiologico legato al consumo di un alimento contaminato deve necessariamente basarsi sul maggior numero di informazioni disponibili sul microrganismo. I dati sulla distribuzione dei ceppi di *L. monocytogenes* 4b che posseggono queste caratteristiche potranno contribuire a una strategia più mirata di valutazione del rischio, e in ultima analisi alla determinazione e successiva adozione di misure preventive atte a inibire o eliminare lo sviluppo dei ceppi epidemici di *L. monocytogenes* 4b in nicchie particolari. Tali dati, perciò, potranno essere utilizzati dalle strutture coinvolte nell'elaborazione della valutazione del rischio microbiologico di un alimento, cioè i laboratori periferici del SSN, gli Istituti Zooprofilattici, l'ISS e il Ministero della Salute.

Eulcoranti artificiali: stima della esposizione per fasce di popolazione vulnerabili

Il consumo di alimenti ipocalorici e le attuali tendenze alimentari, originate da modelli estetici e di riferimento orientati al magro, hanno determinato negli ultimi anni un notevole aumento dell'uso e del consumo degli eulcoranti di sintesi.

In questo contesto risulta necessario procedere a verificare le reali condizioni d'uso di queste sostanze anche alla luce di studi recenti (aspartame) attualmente sotto valutazione da parte delle autorità sanitarie nazionali e comunitarie.

Il progetto prevede la valutazione della esposizione di un segmento di popolazione (diabetici) che per la condizione patologica è direzionato a un maggiore utilizzo di eulcoranti artificiali attraverso la collaborazione con alcuni centri di diabetologia di Roma

Risultati attesi nel triennio

Verifica dei livelli di esposizione di una fascia a rischio per quello che concerne gli edulcoranti artificiali usati in sostituzione dello zucchero

Trasferibilità dei risultati

Eventuale richiesta di revisione dell'attuale normativa comunitaria in materia di additivi alimentari

Effetti di alterazioni metaboliche in corso di obesità sulla funzionalità adipocitaria

L'obesità rappresenta il principale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, per l'ipertensione e per il diabete di tipo 2. Una parte consistente di questo rischio è attribuito ai disordini metabolici che spesso la accompagnano, come iperinsulinemia, iperlipidemia, insulino-resistenza. Oltre che dalla componente genetica, l'obesità è determinata da errati stili di vita, come dieta iperlipidica, scarsa attività fisica, fumo di sigaretta, e è generalmente associata a *stress* ossidativo, con aumento di LDL ossidate. Non è ancora chiaro il *link* che unisce l'obesità alle sue complicanze ma il tessuto adiposo, per la sua attività endocrino-metabolica, sembra

avere un ruolo fondamentale. Lipidi, ossidati e non, e LDL ossidate, capaci di regolare diverse attività cellulari, potrebbero modulare alcune attività specifiche degli adipociti maturi ed essere coinvolti nei meccanismi patogenetici che contribuiscono alla comparsa di obesità e delle sue complicanze.

Il progetto si propone di valutare gli effetti, non solo quantitativi ma anche qualitativi, di specifici componenti della dieta e di prodotti metabolici, dei quali si conosce la capacità di modulare l'espressione genica, e l'attività di fattori regolatori intracellulari. Il progetto studierà, pertanto, in adipociti murini differenziati (3T3-L1) e in colture primarie di adipociti umani, l'effetto di LDL ossidate, di singole specie lipidiche ossidate e di acidi grassi a diverso grado di saturazione, su attività cellulari responsabili dell'omeostasi del tessuto adiposo (proliferazione, differenziamento, apoptosi), nonché su attività peculiari degli adipociti maturi, come la sensibilità all'insulina e la capacità di produrre adipochine ad azione autocrina/paracrina/endocrina.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso la valutazione della capacità di diversi acidi grassi e prodotti di ossidazione nel modulare proliferazione, differenziamento e apoptosi in cellule adipocitarie, il progetto si prefigge di analizzare le relazioni tra i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione della massa grassa, componenti della dieta e prodotti del metabolismo.

Il progetto si propone poi di studiare nelle stesse cellule differenziate e in colture primarie, il meccanismo d'azione e le vie intracellulari coinvolte nella risposta all'insulina e determinare il ruolo dei lipidi, ossidati e non, nell'eventuale comparsa di insulino-resistenza.

Infine verranno valutate le attività funzionali proprie degli adipociti maturi, quali la secrezione di adipochine con specifiche attività (TNF α , leptina, resistina, adiponectina, IL-6) nonché attività enzimatiche coinvolte nel metabolismo lipidico (HSL, LPL, UCP), il cui ruolo potrebbe essere rilevante nell'alterazione della normale funzionalità del tessuto adiposo.

Trasferibilità dei risultati

L'aumento dell'incidenza dell'obesità e delle sue complicanze rende necessario approfondire la comprensione dei meccanismi patogenetici coinvolti. In questo senso l'individuazione di diete controllate per contenuto di acidi grassi, nonché di *pathway* molecolari coinvolti nella risposta recettore-mediata all'insulina e nell'alterata espressione e traslocazione del GLUT4, potrebbero consentire nuovi approcci sperimentali mirati per eventuali terapie in pazienti obesi. Questo garantirebbe una notevole riduzione del costo sociale derivante da quella che rappresenta una delle più importanti emergenze nel mondo occidentale e nel nostro Paese.

Effetti funzionali e meccanismi di trasduzione indotti dalle tossine botuliniche in colture cellulari neuronali

Le neurotossine prodotte da *C. botulinum* sono zinco-endopeptidasi che bloccano la trasmissione sinaptica attraverso la proteolisi di proteine associate alla membrana (SNARE) dei neuroni e implicate nel rilascio di vescicole del neurotrasmettitore acetilcolina.

Per meglio comprendere il meccanismo di azione intracellulare delle tossine prodotte dai diversi ceppi di sierotipo A, già caratterizzati a livello genomico, il progetto di ricerca si basa sulla messa a punto di un sistema colturale *in vitro* che prevede l'utilizzo di neuroni sensoriali prelevati dalla corda spinale (DRG) che sono naturalmente sensibili alla tossina.

Lo studio verterà sull'analisi degli effetti funzionali e temporali dei diversi sierotipi in termini di *onset* e durata di azione all'interno della cellula nervosa nonché sulla determinazione dell'effetto dose-risposta di ciascuna tossina finalizzato a tracciare un profilo cinetico dell'attività endopeptidasica e definire il grado di sensibilizzazione di questo sistema colturale *in vitro*, col fine di renderlo un valido e sensibile strumento di identificazione delle potenzialità

tossiche del *C. botulinum*. Verrà inoltre valutato l'effetto sinergico di cofattori che partecipano al meccanismo di esocitosi (ioni Ca e K, NGF) inducendo modulazione trasduzionale del rilascio di neurotrasmettitore.

Lo studio della risposta delle diverse tossine di tipo A alla stimolazione con diverse concentrazioni di NGF, nei diversi stadi dello sviluppo cellulare, e del loro meccanismo di azione in riferimento all'espressione di *marker* colinergici consentirà inoltre di fare delle valutazioni di carattere morfologico-funzionale.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca si pone l'obiettivo di creare un sistema neuronale *in vitro* rapido e sensibile per verificare l'attività intracellulare e definire la cinetica di azione delle tossine botuliniche prodotte dai differenti ceppi di sierotipo A col risultato di caratterizzare differenze nelle potenzialità tossiche responsabili dell'effetto a livello fisiologico.

Rispetto ad altri sistemi cellulari (PC12, SH-SY5Y) i DRG non necessitano di permeabilizzazione per internalizzare la neurotossina e presentano suscettibilità già a basse dosi. Inoltre la comprensione del meccanismo che regola il traffico vescicolare consentirà di definire vie di traduzione e target intracellulari a livello dei quali poter modulare l'azione endopeptidasica della neurotossina e spiegare perchè in vivo gli effetti paralitici di una singola dose possono persistere per alcuni giorni.

È stato recentemente proposto che l'allungamento dei neuriti durante lo sviluppo del sistema nervoso dipende non solo dall'allungamento del citoscheletro ma anche dall'inserzione di membrana di nuova sintesi a livello delle zone di crescita attraverso fusione vescicolare mediata dall'esocitosi e da proteina SNARE. Pertanto il meccanismo endopeptidasico scatenato dalla tossina e la definizione dei fattori che lo regolano aiuterà a definire possibili vie di correlazione tra i sistemi di rilascio vescicolare di neurotrasmettitori e di regolazione del cono di crescita assonale.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di un sistema basato sull'uso di colture cellulari per il rilevamento della tossina botulinica, qualora provvisto di adeguata specificità e sensibilità, potrebbe potenzialmente sostituire il metodo in vivo su topini attualmente utilizzato per rilevare la sua presenza negli alimenti o nei campioni biologici di pazienti affetti da botulismo.

Il metodo potrebbe pertanto essere utilizzato da tutte quelle strutture del SSN e altre strutture pubbliche e private che non sono dotate di ambienti stabulari per la manutenzione degli animali (quindi non abilitate al test in vivo per la tossina) e che tuttavia sono interessate a svolgere analisi degli alimenti, dei campioni biologici, o preposte al controllo delle preparazioni farmacologiche di tossina botulinica utilizzate in terapia.

Health promoting, safe seafood of high eating quality in a consumer driven fork-to-farm concept - SEAFODplus (Convenzione ISS/Comunità Europea: VI Programma Quadro)

Il progetto si propone di fornire conoscenze scientifiche per consentire un miglioramento della salubrità, del valore nutritivo e della qualità dei prodotti della pesca al fine di ridurre l'incidenza delle maggiori malattie, trasmesse da tali alimenti, e aumentare la salvaguardia del consumatore europeo. Tra le varie problematiche prende in considerazione la qualità e la salubrità dei prodotti della pesca con particolare riferimento ai metodi di analisi per la determinazione e il controllo dei diversi contaminanti e i fattori di rischio ambientali. Particolare attenzione è rivolta ai virus enterici (Norovirus e virus dell'epatite A) agli indicatori della contaminazione fecale dei molluschi e ad altri patogeni emergenti facenti parte della flora marina autoctona, appartenenti alla famiglia delle *vibrionaceae*. Verranno condotti studi per lo

sviluppo di metodi avanzati (PCR classica e *Real time* PCR) e standardizzati per la determinazione dei virus enterici e tecniche che consentano la numerazione, nonché la distinzione tra ceppi di vibriani patogeni e non patogeni. Tali metodi serviranno per la conduzione di studi della cinetica di tali microrganismi durante i processi di depurazione e della loro sopravvivenza durante la conservazione.

Risultati attesi nel triennio

Metodi di PCR classica e *Real time* PCR verranno sviluppati per la determinazione nei molluschi di HAV e Norovirus, che siano affidabili ed efficaci. Verranno condotte prove per l'individuazione di un controllo interno, che consenta di evitare risultati falsamente negativi dovuti all'effetto di sostanze inibenti la reazione di PCR, che possono ritrovarsi nelle varie matrici alimentari. Per la determinazione dei vibriani patogeni si prenderanno in considerazione le tecniche di *colony hybridization* che consentano la numerazione, nonché la distinzione tra ceppi patogeni e non patogeni.

Le metodologie sviluppate verranno quindi utilizzate in studi relativi alla cinetica dei diversi microrganismi durante i processi di depurazione e di conservazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti forniranno un valido contributo per l'identificazione e il controllo del rischio associato al consumo dei molluschi bivalvi e per il miglioramento della qualità delle produzioni di tali prodotti per una maggiore salvaguardia della salute del consumatore.

Indagine conoscitiva sulla listeriosi perinatale in Italia

La listeriosi umana interessa prevalentemente soggetti con sistema immunitario alterato, tra cui le donne in gravidanza e neonati. La listeriosi in gravidanza può verificarsi in ogni momento della gestazione, più frequentemente durante il terzo trimestre ed essere causa di aborto o parto pre-termine. La listeriosi neonatale è una malattia seria, spesso fatale; l'infezione intrauterina può provocare parto prematuro, infezione del liquido amniotico, aborto spontaneo, infezione neonatale, morte neonatale.

Allo scopo di valutare l'incidenza della listeriosi perinatale, si ritiene necessario attivare una sorveglianza, inizialmente nella città di Roma, coinvolgendo ginecologi, neonatologi e pediatri delle maggiori strutture ospedaliere per organizzare incontri aventi come obiettivi la sensibilizzazione verso la problematica emergente dato che, solo di rado, nelle patologie perinatali la *Listeria monocytogenes* viene inserita nei protocolli di ricerca; ne consegue che la malattia è sottostimata a causa di un sistema di sorveglianza poco sensibile. In sede di tali incontri verranno elaborate schede informative sul paziente che devono accompagnare il campione biologico che verrà inviato presso l'ISS per la ricerca e identificazione della *Listeria monocytogenes*. I ceppi isolati verranno sottoposti a caratterizzazione sierologica e molecolare al fine di verificare la prevalenza dei sierotipi e profili molecolari dei ceppi associati a casi di listeriosi perinatale in Italia.

Risultati attesi nel triennio

Ricerca di *Listeria monocytogenes* da campioni biologici mediante metodo colturale e immunoenzimatico e conferma biochimica mediante *kit* disponibili in commercio.

Caratterizzazione sierologica dei ceppi isolati mediante sieri per la determinazione degli antigeni somatici "O" e antigeni flagellari "H".

Caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati mediante PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Confronto mediante software BioNumerics dei sierotipi e pulsotipi dei ceppi di *L. monocytogenes* isolati durante l'indagine conoscitiva con sierotipi e pulsotipi di ceppi isolati nel

corso di controlli ufficiali e di sorveglianze condotte sul territorio nazionale, per verificare quali tipi di alimenti sono maggiormente associati con casi di listeriosi perinatale.

Trasferibilità dei risultati

Formulazione di linee guida destinate alle donne in gravidanza (consigli alimentari e di igiene domestica).

Estensione della sorveglianza attiva ad altre strutture ospedaliere presenti sul territorio nazionale.

Indagine epidemiologica per la ricerca di spore di clostridi neurotossigeni nelle feci di neonati al di sotto di un anno di età, con quadro clinico di stipsi e ipotonia

Il botulismo infantile è una tossinfezione intestinale causata da clostridi produttori di neurotossine botuliniche, che colonizzano temporaneamente il lume intestinale del neonato. L'infezione è favorita da una alterazione della flora intestinale. Molti casi sono stati descritti nei primi sei mesi di vita, con un'età media di 13 settimane. La manifestazione clinica può variare da una forma lieve a una fulminante, che è indistinguibile dalla morte improvvisa del lattante. I sintomi includono: pianto flebile, riduzione dell'appetito, letargia, ptosi, stipsi, ipotonia generalizzata e progressiva e distress respiratorio.

Dall'analisi dei dati epidemiologici dei 23 casi studiati presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, risulta che stipsi e ipotonicità rappresentano i segni clinici più ricorrenti (nel 95% dei casi riportati) e presenti anche nelle forme più lievi della malattia. Si intende quindi monitorare la presenza di eventuali spore di clostridi neurotossigeni nelle feci di neonati che presentano questo quadro sintomatologico anche al fine di identificare quelle forme della malattia molto lievi. Lo scopo della presente proposta di ricerca verrà raggiunto in diverse fasi:

- redazione di una scheda *ad hoc* per la raccolta dei dati anamnestici dei pazienti;
- ricerca di spore di clostridi neurotossigeni mediante metodiche classiche e biomolecolari;
- caratterizzazione biochimica e molecolare degli isolati;
- analisi statistica dei risultati ottenuti.

Risultati attesi nel triennio

sensibilizzazione dei pediatri alla formulazione del sospetto diagnostico di botulismo infantile ogni qual volta si presentino pazienti con quadro clinico di stipsi e ipotonia;

individuazione di forme lievi di botulismo.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti mediante questa indagine epidemiologica contribuiranno a una più rapida e precoce individuazione della malattia.

Integratori alimentari con ingredienti erboristici: caratterizzazione botanica di piante ed estratti attraverso l'analisi degli aminoacidi liberi

I derivati di piante vengono utilizzati, in associazione e a complemento della componente nutrizionale, negli integratori alimentari. Tra i problemi associati all'utilizzo di tali preparazioni è da considerare in primo luogo l'esatta identificazione botanica soprattutto nel caso di generi/specie che comprendono anche quelle tossiche. La definizione di criteri distintivi per il riconoscimento di una pianta rimane, dal punto di vista della sicurezza d'uso di tale tipologia di prodotti, una questione fondamentale. Tra gli elementi caratterizzanti, il *pool* degli aminoacidi liberi, anche se quantitativamente non rilevante, potrebbe rappresentare dal punto di vista qualitativo, un importante fattore discriminante.

Infatti per alcune piante gli aminoacidi liberi già ne rappresentano un elemento caratterizzante in quanto costituiscono il principio attivo come nel caso del 5-idrossi-triptofano della *Griffonia simplicifolia* e dell'acido gamma-amminobutirrico della *Sutherlandia frutescens* e della *Passiflora incarnata*. Nell'ambito del progetto verrà determinato il *pool* degli aminoacidi liberi di un'ampia gamma di piante utilizzate nella preparazione di integratori a base vegetale sia come ingrediente grezzo che come estratto idroalcolico essiccato, al fine di introdurre un ulteriore discriminante per una corretta caratterizzazione botanica.

Gli aminoacidi liberi una volta estratti verranno analizzati mediante HPLC previa derivatizzazione con 9-fluoroenilmetil-cloroformato (FMOC) e rivelazione fluorimetrica.

Risultati attesi nel triennio

I risultati relativi al profilo degli aminoacidi liberi delle piante o estratti, selezionati in base alla loro utilizzazione negli integratori alimentari, potranno essere utilizzati per allestire una banca dati di profili cromatografici, una volta verificata la riproducibilità.

In seguito alla valutazione dei profili ottenuti ci si attende di poter individuare come componente caratterizzante:

un singolo aminoacido libero per alcune piante;

un rapporto tra due aminoacidi particolari o fra uno e il totale degli aminoacidi liberi per altre piante;

Nel caso in cui si identifichi un aminoacido quale elemento distintivo di una determinata specie botanica la sua concentrazione potrà essere utilizzata per la standardizzazione.

Trasferibilità dei risultati

Gli esiti del progetto costituiranno un utile supporto informativo per la comunità scientifica e per tutti i soggetti coinvolti nella produzione, controllo e consumo degli integratori alimentari.

In particolare tutte le informazioni acquisite saranno trasferibili:

ai produttori che attraverso una verifica della identificazione della specie botanica, assicurano che la qualità di ciascun lotto di materia prima sia conforme alla "dichiarazione della sorgente botanica";

agli organi di controllo per evidenziare casi di sofisticazione accidentale o fraudolenta con altre piante contenenti principi tossici o prive di attività;

al mondo scientifico, interessato allo studio della fitochimica delle piante officinali, come ulteriore supporto informativo.

Interazione di biofenoli con i meccanismi regolatori intracellulari

Nell'ultimo decennio i polifenoli hanno riscosso un notevole interesse da parte della ricerca e dell'industria alimentare soprattutto in virtù delle loro proprietà antiossidanti. Tuttavia molte evidenze indicano che queste molecole sono in grado di modulare funzioni e attività cellulari specifiche, attraverso meccanismi ancora non del tutto conosciuti, ampliando così il loro ruolo potenziale nella prevenzione di patologie. In particolare essi sono in grado di modulare espressione genica, attività enzimatiche e funzioni recettoriali. Il progetto si prefigge di valutare il ruolo di composti fenolici contenuti negli alimenti nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, focalizzando lo studio sui meccanismi con cui essi contrastano particolari eventi biomolecolari coinvolti nella patogenesi della lesione vasale, come la ossidazione delle LDL e il loro *uptake* da parte dei macrofagi.

Composti fenolici possono agire sia direttamente mediante meccanismi che modificano le interazioni cellula-oxLDL, sia indirettamente attraverso la modulazione di geni implicati nello *stress* ossidativo oxLDL-indotto. In tale contesto il progetto si propone di valutare se composti fenolici presenti in alimenti tipici della dieta mediterranea, siano in grado di: a) modulare, e attraverso quali *pathway* di *signalling* intracellulare, l'attività del recettore *scavenger*

macrofagico (CD36) coinvolto nella formazione delle *foam cells* e 2) attivare, e con quali meccanismi, *pathway* specifici di difesa antiossidante nelle cellule macrofagiche.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si prefigge pertanto di valutare l'effetto di tali composti fenolici su un evento chiave della patogenesi dell'aterosclerosi quale è l'*uptake* di oxLDL tramite il recettore *scavenger*, con particolare riferimento alla comprensione dei meccanismi di regolazione della trascrizione, traduzione e traslocazione sulla superficie di membrana. Inoltre, lo studio sarà indirizzato a dimostrare il coinvolgimento di *pathway* specifici di difesa antiossidante intracellulare come l'attivazione delle sequenze ARE/EpRE (*Antioxidant/electrophile Response Elements*), responsabili dell'espressione genica di enzimi di fase II, e il coinvolgimento di MAPchinasi e/o il rilascio di fattori nucleari come Nrf2.

Trasferibilità dei risultati

L'ampliamento delle conoscenze sulla regolazione del recettore *scavenger* nonché la comprensione a livello molecolare degli effetti di polifenoli, non strettamente legati alla loro specifica attività antiossidante, rappresenteranno un aspetto importante nella comprensione dei meccanismi responsabili della loro attività protettiva, ciò rappresenterà il fondamento essenziale per fornire nuove indicazioni su possibili strategie sperimentali di intervento terapeutico.

L'utilizzo di metodi di Real Time-PCR per la determinazione e quantificazione dei microrganismi patogeni negli alimenti da applicare alla valutazione del rischio

La determinazione dell'esposizione di una popolazione a un rischio, uno dei quattro punti in cui si articola l'analisi del rischio, richiede la produzione di dati specifici riguardo la prevalenza o il numero di microrganismi presenti ai vari punti della catena alimentare.

La disponibilità di dati relativi alle contaminazioni microbiologiche sono alquanto limitati e spesso difficilmente utilizzabili in quanto ottenuti con metodi di campionamento diversi o con metodi analitici poco a affatto affidabili. I metodi microbiologici classici sono spesso molto complessi e richiedono più giorni per produrre un risultato. Inoltre la determinazione quantitativa è spesso basata sull'utilizzo della metodica MPN, che oltre ad essere molto complessi producono risultati con un alto grado di variabilità. L'utilizzo dei metodi di biologia molecolare e in particolare la PCR, sembrano poter rispondere a queste esigenze in quanto rapide e automatizzate. Tra queste le tecniche di *Real-Time* PCR posseggono la caratteristica di fornire risultati quantitativi affidabili e riproducibili.

Risultati attesi nel triennio

La messa a punto di metodi di *Real-Time* PCR darà la possibilità di disporre di metodi analitici da poter impiegare nella valutazione del rischio.

Tali metodi saranno sottoposti a *ring trial* cui parteciperanno un numero di laboratori sufficienti (>10) per validare tali tecniche in accordo con la norma Europea 16140. L'utilizzo della stessa tecnica analitica per la valutazione della prevalenza e/o quantificazione dei patogeni presenti permetterà di avere dati analitici omogenei che permetteranno di procedere a valutazioni del rischio con bassi livelli di incertezza.

Trasferibilità dei risultati

I metodi saranno trasferiti ai laboratori del SSN, che inoltre saranno supportati da *Ring trial* che permetteranno la loro validazione in accordo alla norma ISO 16140. Tali metodi potranno essere utilizzati in piani di monitoraggio o in *challenger test* per la valutazione della esposizione di una popolazione o in studi di ecologia batterica per sviluppare una corretta analisi dei rischi microbiologici.

Livelli tissutali di acidi grassi insaturi nei soggetti normali e nei pazienti neoplastici

È stata evidenziata una correlazione tra diete ricche in acidi grassi omega 6 e alcune forme di degenerazione cellulare (a livello mammario e prostatico) mentre diete ricche in acidi grassi omega 3 sembrano avere effetto inibente. Derivati metabolici dell'acido arachidonico possono quindi essere ritenuti, tramite l'azione delle cicloossigenasi², promotori di crescita tumorale. Acidi grassi omega 3 quali il DHA e EPA sembrano invece esercitare una benefica azione competitiva nell'utilizzo delle cicloossigenasi 2. Ci si propone quindi di verificare se in soggetti portatori di neoplasie maligne il contenuto in PUFA sia significativamente diverso da quello dei soggetti sani.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione dei livelli di PUFA in soggetti sani e oncologici.

Trasferibilità dei risultati

Acquisizione dati relativi alla genesi e sviluppo di patologie di grande rilevanza e formazione banca dati. Eventuali modificazioni nella dieta di individui con squilibri nel rapporto omega 6/ omega 3.

Meccanismi molecolari coinvolti nella protezione esercitata da composti fenolici naturali contro l'azione proapoptotica di LDL ossidate in corso di aterosclerosi

Le lipoproteine a bassa densità (LDL), ossidate all'interno della parete vasale, sono coinvolte nell'insorgenza di aterosclerosi, che rappresenta una delle più importanti cause di morbilità e mortalità nei paesi occidentali, subite. La formazione della lesione vasale coinvolge diversi tipi cellulari, quali macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, con comparsa di cellule schiumose (*foam cells*), proliferazione cellulare, produzione di fattori chemiotattici e citochine, infiltrazione di monociti e macrofagi, fino a degenerazione della placca ateromatosa e conseguente patologia vascolare. La componente lipidica ossidata delle LDL è responsabile del danno citotossico e dell'alterazione dell'equilibrio *redox* intracellulare, attraverso l'induzione di morte cellulare per apoptosi, i cui meccanismi non sono, però, ancora del tutto chiariti. Componenti della dieta, contenuti in alimenti vegetali, sembrano rappresentare un fattore di protezione importante come evidenziato da studi epidemiologici. Il progetto si propone di valutare, attraverso la definizione delle basi molecolari e cellulari coinvolte nel danno vasale, in linee cellulari primarie e stabilizzate, umane e murine, il ruolo e i meccanismi biomolecolari con i quali specifici nutrienti funzionali della dieta (polifenoli) sono in grado di esercitare un'azione protettiva specifica sul processo di induzione apoptotica, coinvolto nella patogenesi della malattia cardiovascolare.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si prefigge di valutare in modelli sperimentali *in vitro*, i meccanismi molecolari attraverso i quali LDL ossidate, o singoli componenti lipidici ossidati, inducono morte cellulare per apoptosi nonché quelli attraverso i quali antiossidanti fenolici la contrastano. Ci si aspetta di ampliare le conoscenze attuali attraverso l'individuazione dei principali *pathway* molecolari, e, all'interno di essi, dei principali fattori regolatori coinvolti. In particolare si definirà il ruolo, e le reciproche interazioni, di fattori di trascrizione quali p53, e p66SHC indicati solo recentemente come responsabili della relazione causale tra *stress* ossidativo ed esecuzione apoptotica. Si studierà il rapporto tra questi fattori e proteine regolatorie dell'apoptosi indotta da *stress* ossidativo quali Bcl-2, Bax e Bcl-XL e le alterazioni mitocondriali corrispondenti. La definizione di tali aspetti permetterà quindi di individuare i meccanismi di azione specifici

attraverso i quali gli antiossidanti fenolici sono in grado di contrastare l'induzione di apoptosi e di esercitare il loro ruolo protettivo a livello molecolare.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto rappresenta un'opportunità per approfondire la comprensione degli eventi che portano al danno cellulare coinvolto nella patogenesi dell'aterosclerosi, e i meccanismi attraverso i quali antiossidanti esogeni di origine vegetale, quali i polifenoli, esercitano un ruolo protettivo. L'individuazione di meccanismi molecolari specifici e del ruolo svolto da singoli fattori regolatori permetteranno di individuare nuovi possibili *target* verso cui indirizzare l'attenzione degli operatori. Lo studio permetterà di correlare gli effetti di singoli polifenoli contenuti negli alimenti sull'attivazione/inibizione di specifici fattori intracellulari coinvolti nel danno apoptotico. Si offrirà in tal modo un supporto conoscitivo utile alla definizione di strategie di prevenzione, attraverso interventi dietetici mirati, nonché di interventi sperimentali terapeutici basati sull'uso di specifici nutrienti funzionali.

Metodi molecolari per l'identificazione e quantificazione di *Campylobacter spp* e loro applicazione prototipale

Campylobacter sp. è considerato in Europa l'agente più frequente di Tossinfezioni alimentari, ma nel nostro Paese non si conosce l'entità effettiva della sua incidenza, per la mancanza di un controllo organico e omogeneo da parte delle strutture territoriali preposte alla verifica della salubrità alimentare.

Considerate le non agevoli condizioni di coltivabilità di *Campylobacter sp.* che si verificano con l'applicazione di metodiche classiche di arricchimento, isolamento e identificazione, appare utile proporre metodiche alternative rapide di tipo molecolare, in grado di eseguire la differenziazione di specie, la determinazione quantitativa e anche di saper discriminare tra cellule vive e cellule morte.

Per tale motivo saranno sviluppate tecniche di PCR qualitativa e *Real-time* con l'utilizzo del SYBR-*Green* e di sonde molecolari, dotate di controllo interno, al fine di apprezzare la sensibilità della reazione e riconoscere eventuali inibizioni da parte della matrice.

I metodi realizzati verranno applicati anche a scopo prototipale per la quantificazione della sopravvivenza del microrganismo in matrici alimentari carnee in diverse condizioni di temperatura e pH.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto e validazione di metodiche PCR per identificare e quantificare *Campylobacter sp.* ed eventualmente per definirne caratteristiche di patogenicità. Produzione di informazioni aggiuntive sulle caratteristiche di resistenza nelle matrici alimentari ai fini della prevenzione delle specifiche patologie.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di metodiche rapide per l'identificazione di *Campylobacter* in sede di autocontrollo e controllo ufficiale e in occasione di emergenze sanitarie.

Metodi rapidi e innovativi per l'analisi e il controllo di OGM e alimenti contenenti o prodotti a partire da OGM. Unità Operativa: Validazione dei metodi analitici mediante confronto con le metodiche attualmente accreditate a livello europeo (ELISA, PCR e PCR *Real Time*). Programmi speciali art.12 bis, comma 6, DL.vo 229/99

Il progetto si propone di sviluppare metodologie analitiche innovative per la determinazione degli OGM e dei loro derivati nei prodotti alimentari in alternativa alle tecniche tradizionali

(PCR ed ELISA) attualmente validate e impiegate a livello nazionale e comunitario. Gli obiettivi dell'U.O. inizialmente individuati riguardavano quindi essenzialmente la realizzazione di un confronto tra i metodi tradizionali (PCR e ELISA) e quelli innovativi sviluppati nell'ambito del progetto e la loro successiva validazione. Tuttavia durante lo svolgimento delle attività sono emerse difficoltà di tipo tecnico che hanno comportato un ritardo nella realizzazione delle metodologie innovative da validare. Si è deciso quindi di inserire tra gli obiettivi del progetto anche la valutazione dell'influenza dei processi tecnologici sulla tracciabilità degli OGM nella filiera ago-alimentare e mangimistica. In particolare l'U.O. ha avuto come obiettivo lo sviluppo e la validazione di metodi analitici mediante PCR *Real Time* idonei alla valutazione della tracciabilità della soia *Roundup Ready* (soia RR) lungo la filiera produttiva. Infatti numerosi studi hanno evidenziato alcune difficoltà nella determinazione di OGM in alimenti e mangimi derivanti dalla degradazione del DNA e delle proteine ad opera dei processi tecnologici di produzione. Inoltre, alcuni studi più recenti hanno evidenziato sia per la soia RR che per alcune linee di mais GM, differenze significative nella concentrazione di OGM riscontrata negli alimenti e quella relativa alle materie prime utilizzate per la loro produzione.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione di metodi innovativi relativamente alla loro robustezza e applicabilità mediante la verifica dei seguenti parametri: specificità, linearità, intervallo di applicabilità, accuratezza, precisione, limite di rivelabilità e limite di quantificazione.

Validazione di metodiche analitiche alternative mediante studi di validazione.

Valutazione della tracciabilità analitica lungo la filiera di produzione industriale della soia.

Verifica dell'applicabilità dei metodi innovativi lungo la filiera di produzione industriale della soia *Roundup Ready*.

Trasferibilità dei risultati

L'evoluzione della normativa specifica ha comportato la necessità di un adeguamento della relativa diagnostica. Infatti sia il controllo del rispetto degli obblighi di etichettatura e sia i nuovi orientamenti legislativi, che introducono il concetto di tracciabilità nella filiera produttiva, comportano la necessità di avere e da parte del produttore e da parte dell'ente preposto al controllo ufficiale, metodi analitici affidabili e applicabili per la determinazione di OGM nelle varie matrici alimentari. In tale ambito la disponibilità di metodi innovativi rapidi è di grande utilità per il settore produttivo al fine di implementare la realizzazione del sistema di tracciabilità e dei piani di autocontrollo previsti dalla normativa vigente.

Inoltre, anche nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti, la validazione e la successiva divulgazione delle metodiche analitiche messe a punto rappresenta un progresso dell'armonizzazione nella diagnostica attualmente utilizzata dalle differenti strutture preposte al controllo ufficiale degli alimenti.

Monitoraggio e promozione dei consumi di frutta e verdura nella popolazione per la valutazione del loro impatto sulla prevenzione della malattie cronicodegenerative

Sono ormai molte le evidenze scientifiche basate su studi epidemiologici e clinici che dimostrano come fra i fattori di rischio per obesità, malattie cardiovascolari, diabete di tipo2 e alcuni tipi di cancro, diventati ormai problemi sanitari "globalizzati", ci siano abitudini alimentari errate, in primo luogo un insufficiente consumo di frutta e verdura. Frutta e verdura costituiscono un'importante parte della dieta dato il loro contenuto in vitamine, micronutrienti essenziali, fibre, proteine vegetali e componenti biofunzionali. Qualsiasi serio programma di prevenzione delle malattie cronicodegenerative, che rappresentano un costo sociale molto elevato anche in Italia, deve avere come uno degli obiettivi principali quello di aumentare il

consumo giornaliero di frutta e verdura, anche attraverso il coordinamento delle attività di tutti i settori pubblici e privati. Il raggiungimento di tale obiettivo deve coinvolgere necessariamente le politiche agricole, alimentari e sanitarie nazionali, prevedere lo stanziamento di fondi per aumentare la disponibilità e accessibilità dei prodotti vegetali mediante l'abbassamento dei costi di produzione e dei costi al consumo, nonché la promozione di campagne pubblicitarie attraverso la distribuzione di opuscoli, la produzione di *poster*, l'uso di siti *web* e *spot* radiotelevisivi. Il progetto si prefigge di rafforzare le conoscenze scientifiche sugli effetti positivi di una dieta ricca in frutta e verdura attraverso la raccolta dei dati disponibili e di nuovi studi scientifici mirati, così da contribuire allo sviluppo di appropriate linee guida. Parallelamente, si proporranno e coordineranno nuove strategie di intervento al fine di condividere le informazioni ottenute attraverso programmi e campagne mirati alla promozione del consumo di frutta e verdura che saranno sottoposti ad attenta verifica dei benefici raggiunti.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo iniziale di questo progetto sarà quello di sviluppare metodi validi per il monitoraggio dei consumi di frutta e verdura, sia a livello di popolazione che individuale, e l'individuazione di fattori che possono influenzare tali consumi. Ciò permetterà di monitorare i consumi attuali di frutta e verdura a livello nazionale e locale, nelle diverse classi di età della popolazione, correlandoli all'incidenza di patologie cronico-degenerative non trasmissibili nelle stesse popolazioni.

Queste informazioni saranno associate alla raccolta di dati scientifici, derivanti da sperimentazioni *in vivo* e *in vitro*, che offrano nuove e significative indicazioni circa l'efficacia di componenti vegetali specifici nella prevenzione di patologie.

Saranno inoltre proposte e coordinate campagne di educazione alimentare e sanitaria che coinvolgano popolazioni scolastiche (studenti, genitori e insegnanti), gestori e utenti di mense pubbliche e private, operatori sanitari (medici di base, medici sportivi, nutrizionisti, dietisti). Infine si proporranno e coordineranno programmi-pilota di intervento sul territorio in popolazioni ristrette seguendole nel tempo al fine di verificare gli effetti raggiunti: aumento del consumo di frutta e verdura e correlazione con l'incidenza di malattie croniche.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni raccolte dai dati scientifici e dagli studi di popolazioni, aumenteranno le conoscenze sull'uso di diete ricche in vegetali e sul loro ruolo nella prevenzione delle patologie cronico-degenerative non trasmissibili. La definizione di metodi di monitoraggio permetterà non solo la valutazione dei consumi, ma anche la verifica dei risultati raggiunti dagli studi di intervento sulla popolazione permettendo la verifica della loro efficacia. Infine, la promozione su vasta scala di campagne di educazione alimentare, mirate alla diffusione di corretti stili di vita e adeguatamente supportate da istituzioni pubbliche e private, permetterà una diffusione sul territorio delle conoscenze, capace, a lungo termine, di determinare una risposta in termini di prevenzione e di riduzione della diffusione di patologie come obesità, malattie cardiovascolari, diabete e cancro, e una ricaduta sulla salute pubblica in termini di riduzione del costo sociale sostenuto dal SSN.

Nuove metodologie di identificazione e di indagine da sviluppare nell'ambito dei LNR del CNQARA (rispettivamente per molluschi, per botulismo e per latte) da trasferire al SSN

Nell'ambito delle prossime normative emanate dalla UE viene ribadito il concetto che l'assicurazione della qualità igienica dei prodotti alimentari è demandata al produttore, sempre sotto sorveglianza delle autorità pubbliche competenti. In tale contesto è importante la disponibilità di metodi di analisi affidabili, rapidi e che consentano anche la numerazione dei

contaminanti presenti ai fini di una valutazione del rischio. In alcuni settori e per particolari parametri al momento attuale le conoscenze metodologiche non sono tali da soddisfare l'esigenza.

Attualmente per alcuni parametri, quali ricerca di spore e tossine botuliniche e determinazione di biotossine algali i metodi normalmente utilizzati si basano su prove biotossicologiche su topo, che presentano notevoli problemi di ordine organizzativo e etico. Da qui la necessità di sviluppare metodiche alternative che assicurino le stesse *performance*.

Verranno sviluppate metodiche molecolari di PCR *Real-time* qualitativa e quantitativa per la determinazione dei geni codificanti le tossine botuliniche A,B,E,F e metodiche basate sull'utilizzo dei biosensori e colture cellulari per la ricerca delle tossine algali per l'applicazione su matrici sia biologiche (*Cl.botulinum*) che alimentari. Verranno inoltre sviluppati metodi di *screening* microbiologici e biosensoriali per la ricerca degli inibenti nelle matrici alimentari animali.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di *primers*, sonde e controllo interno per *Real-time* PCR *simplex* e *multiplex*;

Sviluppo di una metodica per determinazione e la quantificazione dell'mRNA codificante per le tossine botuliniche in matrici alimentari;

Sviluppo immunosensori in grado di rilevare le tossine botuliniche in matrici alimentari e biologiche;

Sviluppo di metodi che utilizzano biosensori enzimatici e/o metodi su colture cellulari per la determinazione di tossine del gruppo DSP, con particolare riferimento alle yessotossine, e PSP.

Sviluppo e validazione di metodi di *screening* microbiologici e biosensoriali per la ricerca degli inibenti nelle matrici alimentari animali;

Standardizzazione mediante saggi comparativi delle metodiche alternative sviluppate con quelle attualmente in uso.

Trasferibilità dei risultati

Le metodiche alternative sviluppate per la determinazione delle spore e tossine botuliniche e per le tossine algali e i nuovi metodi di *screening* per la ricerca degli inibenti potranno esseri trasferiti ai laboratori del SSN e consentiranno una riduzione dei tempi di analisi e, relativamente alle tossine, dell'uso di animali da laboratorio

Obesità e adolescenza : Ricerca di fattori biochimici per la valutazione del rischio

Il NIH ha definito in maniera chiara i concetti di sovrappeso e obesità, che rappresenta il principale fattore di rischio per l'insorgenza di malattie cardiovascolari e diabete di tipo 2. L'obesità è una condizione complessa e difficile da controllare, influenzata da fattori comportamentali: le abitudini alimentari, l'esercizio fisico, ma anche da fattori ereditari e psicologici. Considerando il notevole impatto che l'obesità e le sue complicanze hanno sull'individuo e sulla società, diventa imperativa la necessità di elaborare e sperimentare nuovi approcci terapeutico/nutrizionali rivolti al ripristino di una omeostasi tissutale notevolmente alterata. A tal fine è obbligatorio l'approfondimento delle conoscenze su aspetti biochimico-molecolari dell'obesità e delle sue complicanze metaboliche e cardiovascolari. L'obesità è accompagnata da alterazioni metaboliche (dislipidemia, intolleranza al glucosio e insulino-resistenza,) che si associano ad alterazioni dell'equilibrio *redox*. Peraltro, numerosi *pathway*, associati all'attività endocrino-metabolica del tessuto adiposo, rappresentano meccanismi in grado di indurre *stress* ossidativo, e è stata descritta una diminuzione di sostanze antiossidanti nel plasma di soggetti obesi e una proporzionalità diretta tra BMI e marcatori di *stress* ossidativo. Il progetto si prefigge di caratterizzare lo stato *redox* in individui di età scolare,

normopeso, in sovrappeso o obesi, valutando sostanze proossidanti e antiossidanti strettamente correlati allo stato di nutrizione e ai livelli di attività fisica svolta; saranno valutati inoltre aspetti molecolari riferibili alla funzionalità del tessuto adiposo. A questo si affiancherà la distribuzione di uno specifico questionario alimentare e comportamentale al fine di ottenere informazioni sul consumo di nutrienti strategici e la disponibilità a modificare le abitudini di vita (modello degli stati di cambiamento), nonché la realizzazione di un programma informatico (biostatistico e con la metodica delle Reti neurali Artificiali) per la valutazione previsionale del rischio patologico nella popolazione oggetto dell'indagine.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si prefigge di acquisire informazioni a livello bio-molecolare, finora scarsamente indagate, allo scopo di elaborare e sperimentare nuove prospettive terapeutiche in una patologia come l'obesità che ha importanti risvolti socio-sanitari. Si sottolinea l'aspetto innovativo della ricerca che oltre all'impiego di sistemi informatici avanzati, affronta aspetti biochimico-molecolari che potrebbero evidenziare la reale portata del danno da errata alimentazione e aprire nuove prospettive terapeutiche.

La caratterizzazione dello stato *redox*, la valutazione di sostanze proossidanti e antiossidanti nei diversi stati nutrizionali porteranno informazioni utili per elaborare approcci terapeutico-nutrizionali idonei. In particolare saranno determinati sul sangue: 1) la quantità di antiossidanti enzimatici e non enzimatici; 2) il corredo lipidico nei suoi componenti essenziali compresa la composizione in acidi grassi degli esteri del colesterolo e dei fosfolipidi; 3) la concentrazione di LDL ossidate, TNF α e IL6; 4) la quantità di adiponectina e grelina; infine 5) gli isoprostani urinari. Tutti i dati raccolti con il questionario costituiranno il *database* per l'elaborato informatico che permetterà il confronto automatico dei dati di consumo giornaliero con i LARN e la preparazione della video-informazione 3D che, al di là di un mero intervento di comunicazione sull'educazione nutrizionale, pongano il soggetto di fronte alla consapevolezza delle alterazioni che caratterizzano l'evento patologico che lo colpisce.

Trasferibilità dei risultati

È prevedibile che i risultati della ricerca saranno trasferibili a medio e lungo termine al 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 e farmacologici; 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 nuovi strumenti diagnostici e di verifica di efficacia terapeutica.

Inoltre, mediante questionari *ad hoc*, realizzati con criteri innovativi, in modo rapido e elementare, si verificheranno i consumi dei nutrienti strategici e la disponibilità al cambiamento dello stile di vita. In questa operazione si può prevedere il coinvolgimento dei pediatri delle Regioni e/o delle Provincie che parteciperanno allo studio, nonché una estensione della distribuzione dei questionari a tutta la popolazione scolastica.

Al termine del progetto si disporrà pertanto di un osservatorio sui consumi alimentari, gli stili di vita, e la connessione con le eventuali patologie, che potrà essere di supporto alla individuazione di idonee strategie di politica alimentare nell'ambito della ristorazione collettiva, delle mense, dei supermercati e degli interventi sociali a difesa del cittadino.

Prevenzione delle tossinfezioni alimentari in ambito domestico

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (1995), nell'ambiente domestico si verificherebbe almeno il 30% del numero complessivo di tossinfezioni alimentari. Studi condotti tra il 1990 e il 2000 nel Regno Unito, Olanda, Spagna e Italia suggeriscono perfino che,

tra le tossinfezioni dovute a Salmonella e Campylobacter, una percentuale di oltre il 50% si verificò tra le mura domestiche (Scott E., Bloomfield S., 2001).

Nel 7th report (2001) del WHO *Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe* (periodo 1993-98), risultano preminenti come luogo del verificarsi di t.a. l'ambiente domestico e la ristorazione scolastica.

Per ridurre o prevenire la comparsa di eventi negativi dal punto di vista igienico-sanitario è quindi necessario promuovere l'adozione di buone pratiche igieniche anche tra i consumatori, i quali sono chiamati a dare il loro importante contributo.

Premessa di ciò sarà l'acquisizione di dati specifici mediante indagini conoscitive sui comportamenti alimentari in collaborazione con gli Enti Locali e la promozione di attività rivolte alla prevenzione delle t.a. in ambito domestico.

Risultati attesi nel triennio

Dati derivanti dalle indagini conoscitive sulle abitudini alimentari a livello domestico.

Elementi per impostare corsi di formazione destinati alle associazioni e al personale addetto all'assistenza degli anziani e dei soggetti a rischio in genere, ai fini della prevenzione delle t.a. in ambito domestico.

Trasferibilità dei risultati

Verranno elaborati documenti e forniti elementi per realizzare materiale anche divulgativo che verrà utilizzato dal Servizio Sanitario Nazionale allo scopo di informare ed educare i consumatori.

Problematiche connesse all'impiego di farmaci veterinari ad azione antibatterica in specie animali minori d'interesse commerciale e di consumo nel nostro Paese

Farmaci ad azione antimicrobica sono largamente impiegati sia nella terapia veterinaria sia come promotori di crescita nell'alimentazione degli animali da reddito. La vastità di tale impiego è causa inevitabile della presenza di residui negli alimenti. Tale presenza desta preoccupazioni per la salute del consumatore tanto da aver indotto i governi dell'UE a introdurre nella propria legislazione concentrazioni massime di residui tollerate (L.M.R.) negli alimenti. I principali timori riguardano: la possibile sensibilizzazione allergica degli individui esposti; l'eventualità che si selezionino ceppi di batteri antibiotico-resistenti; la pressione selettiva che residui di farmaci ad azione antimicrobica possono esercitare sulla microflora intestinale dell'uomo, anche a concentrazioni inferiori ai L.M.R.

D'altro canto nella valutazione del rischio derivante dalla presenza di residui di farmaci antibatterici nei prodotti alimentari di origine animale, è importante disporre di studi sulle diverse specie allevate. Le estrapolazioni di specie, effettuate generalmente a partire dai numerosi studi sulle specie maggiori, trascurano, infatti, le possibili differenze di metabolismo, bioaccumulo, condizioni d'allevamento, ecc. Di fatto, le informazioni riguardanti specificatamente le specie minori, sono tuttora molto carenti nonostante talune specie, quali conigli, prodotti ittici d'acquacoltura, latte di pecora e capra, ecc., siano largamente consumate in alcune regioni geografiche europee (e.g. Mediterraneo). Scarse sono anche le informazioni riguardo l'influenza dell'impiego di antibatterici su specie minori e la selezione negli animali e/o nell'ecosistema di batteri resistenti e, soprattutto, sull'incidenza nella trasmissione di quest'ultimi all'uomo attraverso i relativi prodotti alimentari.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione del rischio associato alla presenza di residui di farmaci veterinari ad azione antibatterica in prodotti alimentari d'origine animale derivanti da specie minori.

Valutazione del rischio associato agli effetti sinergici e antagonisti di residui di farmaci veterinari antibatterici con altri xenobiotici presenti nei prodotti suddetti.

Sviluppo di tecniche di controllo *on line* e *at line* idonee per la determinazioni in tempo reale di situazioni a rischio negli allevamenti zootecnici.

I predetti obiettivi saranno conseguiti mediante:

Studi di farmacocinetica, deplezione e accumulo di farmaci veterinari antibatterici (chinoloni, macrolidi, sulfamidici, ecc.) nei diversi tessuti e fluidi di specie d'allevamento considerate minori (conigli, lattini di capra e pecora, orate, spigole, anguille, ecc.).

Studi *in vitro* di induzione/inibizione enzimatica (P450, glutatione trasferasi, UDP-glucuronosil trasferasi, N-acetil trasferasi, ecc.) su frazioni cellulari epatiche:

di animale, per studi di interazione metabolica nelle diverse specie, per verificare l'eventuale produzione di sostanze tossiche di neoformazione o di impreviste quantità di esse, durante la vita dell'animale;

umane, per studi di interazione metabolica nell'uomo, una volta che l'alimento è stato ingerito.

Messa a punto di sensori specifici non-invasivi ad elevata prestazione per la determinazione di residui di farmaci veterinari antibatterici nei tessuti e fluidi animali.

Trasferibilità dei risultati

Verifica della congruità tra i LMR (laddove contemplati per la specie animale) e i tempi di sospensione previsti. Per i farmaci veterinari ad azione antibatterica consentiti per altre specie animali, ma per i quali non sono stati ancora individuati LMR per i prodotti derivanti da specie minori, valutazione degli studi di farmaco cinetica e deplezione tissutale per definire LMR e relativi tempi di sospensione. Verifica della validità del principio di estrapolazione per fissare LMR su specie minori partendo dai dati ottenuti su specie maggiori. Esame critico dei risvolti tossicologici derivanti dagli studi *in vitro* di induzione/inibizione enzimatica su cellule epatiche animali e umane per individuare effetti sinergici e/o antagonisti tra residui di farmaci antibatterici e altri xenobiotici che possono rappresentare un ulteriore fattore di rischio per il consumatore. La produzione di dati in merito è presupposto indispensabile per l'emanazione di norme che disciplinino la materia in modo più appropriato. Infine, la messa a punto e l'ottimizzazione di tecniche di controllo *on line* e *at line* risulta determinante per avere un sistema produttivo efficace e nello stesso tempo in grado di garantire la sicurezza d'uso dei prodotti alimentari d'origine animale. In aggiunta tali tecniche costituirebbero un valido supporto per l'applicazione dell'autocontrollo secondo metodiche HACCP nella produzione zootecnica. A riguardo si rammenta che l'obbligatorietà dell'autocontrollo estesa anche alla produzione primaria sposta il campo di intervento del controllo ufficiale dal prodotto al processo.

Progetto EU VI Programma Quadro "Integrated project - co-extra "GM and non GM supply chains: their co-existence and traceability (CO-EXTRA)" – WP4: "Development of testing and sampling approaches"

The objective of Co-Extra is to develop comprehensive tools and methodologies and integrate them along with existing ones into embedded decision-support systems aimed at enabling co-existence between GM and non GM (conventional and organic) crops; tracing of genetically modified organism (GMO) materials and derived products, along the food and feed chains; anticipating the future expansion of GMOs. Tools and methodologies will be assessed not only from the technical point of view but also with regard to economic, administrative and legal aspects. A survey of practices and GMO-related legal regimes within and outside the EU will also be part of Co-Extra. The project is designed to include exchange with all of the stakeholders involved in the food and feed chains all along the project running to ensure actual applicability of all of the results.

The objective of WP4: “Development of testing and sampling approaches” aims to develop efficient sampling and testing approaches to uniformly cover the whole supply chain. The WP aims to develop novel statistical approaches for these purposes, in particular for the combination of the measurement uncertainty of different analytical steps, for developing the experimental design guidelines for validating novel methods such as arrays and for accumulating the sampling and testing results through the food supply chain. In addition, the WP aims to efficiently disseminate up-to-date information about the best-possible methods and testing and sampling approaches to implement the traceability at different steps of the food and feed supply chain.

Risultati attesi nel triennio

Guidelines for the implementation of the modular validation approach (scientific publication).

Guidelines for the validation and experimental design of novel methods (scientific publication).

Guidelines of the best practices of sampling.

Guidelines for the adaptation of methods and their proper application.

Statistical model for the combination of uncertainties of the different steps of the modular method approach.

Three to five validated methods, submitted for standardization

Novel sampling approaches.

Guidelines for control plans for the food and feed supply chain.

Guidelines to calculate and reduce measurement uncertainty.

Trasferibilità dei risultati

Contribution to standards: Standardisation is a key issue to provide to stakeholders harmonised rules and tools to implement national reliable and cost-effective traceability methods but also to prevent international disputes.

Contribution to policy developments: Co-Extra will contribute to reinforce the European Research Area through strong collaboration with existing European centres, networks and projects as well as several third countries. Privileged access of ENGL's members to Co-Extra results will also ensure feedback from the numerous laboratories of this network.

Economic impact: in this context, it is more than likely that countries that are capable to ensure co-existence of GM and non GM crops and provide reliable traceability all along the food and feed chains would get advantage in the international competition as they will be in the position to offer guaranteed freedom of choice for all of the stakeholders, from producers to final consumers.

Programma di monitoraggio per la ricerca di contaminanti chimico-fisici nelle derrate alimentari provenienti dalla Bosnia-Herzegovina e dal Kosovo

Il decreto del Ministero della Salute del 27 agosto 2004 impegna l'Istituto Superiore di Sanità a fornire il supporto tecnico-scientifico per la realizzazione di un programma di monitoraggio delle derrate alimentari provenienti dalla Bosnia-Herzegovina e dal Kosovo. Il programma mira alla valutazione dei livelli di presenza di uranio e arsenico nei prodotti provenienti dalle due regioni balcaniche e, in caso di accertata contaminazione di una o più tipologie di alimenti, alla relativa caratterizzazione del rischio. I risultati ottenuti saranno valutati al fine dell'eventuale adozione di misure cautelative per la protezione della salute dei consumatori. Il programma prevede anche la rilevazione dei tenori di cadmio, piombo e mercurio, elementi regolamentati dalla normativa europea sui contaminanti alimentari.

In particolare, il CNQARA dovrà definire i criteri e le modalità di campionamento, mettere a punto i metodi che verranno impiegati dai laboratori coinvolti nelle determinazioni analitiche (IZS Umbria-Marche e IZS Puglia-Basilicata), organizzare e realizzare i circuiti interlaboratorio per l'assicurazione della qualità. Inoltre effettuerà la determinazione dei rapporti isotopici dell'uranio e del tenore di arsenico inorganico in campioni che dovessero superare soglie prefissate di concentrazione dei due elementi. Interverrà infine nella raccolta e valutazione complessiva dei dati analitici.

Risultati attesi nel triennio

Acquisizione di elementi di conoscenza in merito al trasferimento di uranio impoverito nella catena alimentare. Caratterizzazione del rischio in un caso di potenziale contaminazione della catena alimentare. Messa a punto di metodiche analitiche avanzate e realizzazione di un circuito interlaboratorio con gli IZS coinvolti.

Trasferibilità dei risultati

Acquisizione di conoscenze e creazione di un circuito interlaboratorio da impiegare nei programmi di prevenzione e sorveglianza delle contaminazioni alimentari da parte di agenti chimici e chimico-fisici

Promoting Food Safety through a New Integrated Risk Analysis Approach for Foods Contract number: Food-CT-2004-506446 (SAFEFOODS)

This IP consists of a number of interdependent research projects, which will deliver the elements for the construction of the new risk analysis approach (Figure). Results generated in this IP will be incorporated into a new risk analysis framework including also nutrition and labelling issues, which will result in improved consumer confidence in consumer protection activities across Europe. This approach will be based upon qualitative and quantitative methodologies.

In particular, ISS is involved in WP1 and WP3 with the following objectives:

Comparative evaluation of transgenic, organic and conventional maize and potato crops in relation to mycotoxin contamination

Probabilistic exposure assessment of the European consumer by a MonteCarlo approach for mycotoxins, pesticides and natural toxins.

Risultati attesi nel triennio

Major Deliverables

First comparative, interoperable, and user-friendly databases for profiling of foods produced by different breeding approaches and production systems.

Development of a user-friendly, transparent, and easy to use working procedure for identification of new emerging chemical and microbial risks in food production chains.

New approaches for risk modelling of food contaminants and natural toxins, and criteria development for comparative risk analysis including validation of the statistics.

Analysis of food safety risk perceptions of experts, regulators, consumers and other stakeholders regarding novel and conventional foods including labelling and nutritional aspects and validation of the statistics.

Analysis of uncertainties in risk assessment and identification of best practice in communicating risk uncertainty with the public by linking it also to labelling and nutritional issues/policies.

Identification of consumers preference for risk analysis strategies for foods across Europe including labelling and nutritional influences.

User-friendly guidance for evaluation and governance of systemic food risks showing how labelling and nutritional aspects are included.

Realistic, practical, and cost-effective recommendations for improvement in risk management procedures and institutional structure including their influences/links to labelling and nutrition.

New Risk Analysis Approach for food safety management that integrates risk assessment of human health, consumer preferences and values, impact analysis of socio-economical aspects and nutrition as well as labelling issues, and is based on qualitative and quantitative methodologies.

Trasferibilità dei risultati

Major Deliverables

First comparative, interoperable, and user-friendly databases for profiling of foods produced by different breeding approaches and production systems.

Development of a user-friendly, transparent, and easy to use working procedure for identification of new emerging chemical and microbial risks in food production chains.

New approaches for risk modelling of food contaminants and natural toxins, and criteria development for comparative risk analysis including validation of the statistics.

Analysis of food safety risk perceptions of experts, regulators, consumers and other stakeholders regarding novel and conventional foods including labelling and nutritional aspects and validation of the statistics.

Analysis of uncertainties in risk assessment and identification of best practice in communicating risk uncertainty with the public by linking it also to labelling and nutritional issues/policies.

Identification of consumers preference for risk analysis strategies for foods across Europe including labelling and nutritional influences.

User-friendly guidance for evaluation and governance of systemic food risks showing how labelling and nutritional aspects are included.

Realistic, practical, and cost-effective recommendations for improvement in risk management procedures and institutional structure including their influences/links to labelling and nutrition.

New Risk Analysis Approach for food safety management that integrates risk assessment of human health, consumer preferences and values, impact analysis of socio-economical aspects and nutrition as well as labelling issues, and is based on qualitative and quantitative methodologies.

Rilevazione di allergeni negli alimenti

Nei paesi industrializzati le allergie alimentari rappresentano un importante problema per la salute della popolazione; stime effettuate con protocolli spesso non idonei riferiscono di un'incidenza dell'1-3% per gli adulti e del 4-6% per i bambini. Circa il 90% di tutte le allergie alimentari sono attribuibili a 8 alimenti: latte vaccino, uova, crostacei, arachidi, soia, frutta con guscio e cereali; comunque è stato documentato che più di 160 alimenti possono causare forme di allergia. L'unico trattamento universalmente accettato per le allergie alimentari consiste nell'evitare il cibo scatenante, previa educazione del paziente e attenta considerazione delle fonti alimentari occulte. In proposito il legislatore comunitario, ponendo con la Direttiva 2003/89/CE l'obbligatorietà di segnalare in etichetta una serie di allergeni alimentari indipendentemente dalla quantità, ha inteso fornire ai consumatori affetti da allergie alimentari indicazioni utili per conoscere l'esatto contenuto degli alimenti confezionati. A riguardo è indubbio che la ricerca analitica degli allergeni è necessaria per assicurare la conformità degli alimenti alla loro etichettatura e, nello stesso tempo, è indispensabile che siano disponibili metodiche analitiche affidabili e sicure. Questo progetto, considerata la complessità del quadro

analitico relativo agli allergeni, vuole individuare delle metodiche che permettano a tutti gli operatori di controllare gli alimenti con strumenti e protocolli analitici standardizzati

Risultati attesi nel triennio

Dal momento che quantità anche in tracce di allergeni possono scatenare reazioni allergiche è necessario utilizzare metodi analitici estremamente sensibili. La tecnica analitica più frequentemente usata è quella immunoenzimatica denominata ELISA, il successo di questa metodica è legato a molteplici vantaggi che essa offre rispetto a metodi chimici-fisici strumentali (HPLC, HPLC-MS, elettroforesi capillare, PCR) e/o immunologici (RIA, *immunoblotting*, Immunodiffusione, ecc.), quali: facilità di esecuzione, elevata sensibilità, rapidità di risposta. È necessario però che i risultati delle tecniche immunoenzimatiche siano comunque associate a metodi di conferma. Questa ricerca si prefigge lo scopo di individuare metodi di screening, con limiti di sensibilità che riducano i falsi positivi, elevata specificità nella risposta, buona ripetibilità dei dati, per stabilire i limiti di rendimento a cui dovranno attenersi le metodiche applicate nel controllo ufficiale e il mercato dei *kit* commerciali. Inoltre vuole trovare un metodo di conferma che elimini il problema dei falsi positivi combinando la metodica PCR con quella ELISA.

Trasferibilità dei risultati

Le metodiche individuate nel corso della ricerca verranno trasferite:

- agli organi istituzionali di controllo per garantire la conformità dei prodotti alimentari all'etichettatura relativa agli allergeni;
- alle aziende alimentari per riveere il proprio piano di autocontrollo (che prevede le analisi dei rischi e dei punti critici) al fine di evitare contaminazioni crociate nella filiera produttiva
- alla comunità scientifica per fornire strumenti utili all'individuazione delle quantità minime di allergene presente in un alimento in grado di coinvolgere il sistema immunitario e scatenare il quadro clinico dell'allergia alimentare.

Rischio associato alla presenza di perfluorottano sulfonato (PFOS), acido perfluorottanoico (PFOA) e altri composti polifluorurati negli alimenti

Il PFOS, il PFOA e altri composti polifluorurati correlati sono utilizzati in numerosi prodotti a largo uso grazie alle loro proprietà idro-olio repellenti. La loro tossicità è stata poco studiata. Mostrano caratteristiche di persistenza, bioaccumulo, tossicità per i mammiferi e sospetta attività cancerogena e neuroendocrina. Sono stati rivelati nel siero della popolazione generale (3-30 ng/ml) e in sangue e fegato di pesci, uccelli e mammiferi di ecosistemi marini (100-1000 ng/ml). La 3M, primo produttore globale di PFOS, ha annunciato il *banning* volontario dell'uso di PFOS dal 2001.

Si propone di misurare i livelli dei composti polifluorurati suddetti in vari alimenti e di valutare alcuni parametri di tossicità di tali composti ai livelli misurati in specie ittiche, dove i composti bioaccumulano. Saranno evidenziate correlazioni tra le concentrazioni dei composti polifluorurati misurate, induzioni di enzimi del metabolismo epatico ed effetti di interferenza endocrina nelle specie ittiche.

L'esposizione media della popolazione italiana ai composti suddetti attraverso la dieta sarà stimata in base ai dati analitici ottenuti, ai dati di letteratura e ai livelli di assunzione media giornaliera di vari alimenti.

Si propone di sviluppare biomarcatori di esposizione umana ai composti polifluorurati suddetti, misurandone opportuni addotti alle proteine sieriche, cui tali composti si legano stabilmente. I biomarcatori saranno poi utilizzati per valutare l'esposizione della popolazione italiana ai composti suddetti, comparando i livelli di esposizione in diverse regioni italiane e in

diverse fasce di età della popolazione in correlazione ad appositi questionari relativi alla dieta dei singoli individui.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di metodi validati per la determinazione e la quantificazione di PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati in varie matrici alimentari (carne, pesce, latte e prodotti latte-caseari, conserve, miele, ecc.) tramite estrazione seguita da analisi in LC/MS/MS.

Determinazione e quantificazione dei livelli di PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati nelle stesse matrici alimentari.

Valutazione di parametri di tossicità generale (induzioni di enzimi del metabolismo epatico quali CYPs, GSTs, NATs, ecc.) ed endocrina (ormoni tiroidei nel sangue, vitellogenina nei tessuti di specie maschili, ecc.) dei PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati tramite lo studio degli effetti nelle specie ittiche.

Sviluppo di biomarcatori di esposizione umana ai composti polifluorurati, tramite la misura di opportuni addotti alle proteine sieriche.

Stima dell'esposizione media della popolazione italiana a PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati attraverso la dieta tramite monitoraggio alimentare (dati analitici ottenuti nello studio, dati di letteratura e dati di assunzioni medie giornaliere alimentari) e tramite monitoraggio biologico (biomarcatori di esposizione), in relazione ad abitudini alimentari correlate a residenza geografica, età, stili di vita, ecc.

Trasferibilità dei risultati

I metodi analitici per la determinazione dei PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati in vari alimenti saranno validati e quindi divulgati ai laboratori periferici nazionali (ASL, IZS, ecc.), quale strumento utile per il controllo ufficiale degli alimenti per quanto riguarda la presenza di contaminanti chimici ambientali.

I dati di esposizione umana a PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati saranno utili ai fini della valutazione del rischio associato all'assunzione di tali composti tramite la dieta nella popolazione italiana.

Lo sviluppo di biomarcatori di esposizione a PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati saranno utili ai fini di una più accurata ed estesa valutazione dell'esposizione della popolazione generale ai suddetti composti.

Un'adeguata valutazione di rischio dovuto all'esposizione a PFOS, PFOA e altri composti polifluorurati è la base per una più sicura gestione dei rischi: eventuale *banning* e sostituzione dei composti suddetti da tutte le compagnie produttrici e utilizzatrici dei composti, in analogia a quanto già deciso dalla compagnia 3M nel 2000.

Rischio microbiologico connesso alla presenza e persistenza di virus enterici nei prodotti vegetali

Frutta e vegetali sono alimenti pronti per il consumo che possono rappresentare un veicolo significativo per i virus patogeni. I dati più recenti della letteratura internazionale sulle tossinfezioni riportano che i prodotti freschi costituiscono una crescente causa di malattie trasmesse con gli alimenti: tra questi quelli più frequentemente coinvolti sono insalate, lattuga succhi di frutta e frutti di bosco. I prodotti possono essere contaminati dai virus sia durante la fase di crescita in campo a causa della contaminazione delle acque di irrigazione sia durante la lavorazione e manipolazione a causa degli operatori infetti o dell'ambiente contaminato.

I virus di maggior interesse sanitario che possono essere trasmessi attraverso i vegetali sono quello dell'epatite A e i virus gastroenterici con particolare riferimento ai Norovirus.

La maggior parte della contaminazione microbiologica è localizzata sulla superficie di frutta e verdura e le tecnologie attualmente utilizzate per rimuovere gli agenti contaminanti si basano sul risciacquo dei prodotti con acqua potabile o addizionata di disinfettanti a base di cloro.

Il presente studio si propone di studiare la persistenza dei virus in tipologie di alimenti nelle varie fasi di produzione e di trattamento che vanno dalla crescita in campo alle tecniche di confezionamento del prodotto fresco fino all'utilizzo di tecnologie per il prolungamento della *shelf-life*.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale di questa ricerca è quello di mettere in evidenza il comportamento di virus naturalmente presenti o intenzionalmente aggiunti ai prodotti vegetali e ai loro derivati. Nella prima fase del progetto verrà messo a punto un metodo per la determinazione dei virus nei vegetali che possa essere utilizzato nel controllo routinario di tali prodotti. Inoltre dai risultati ottenuti forniranno informazioni circa la persistenza dei virus nei prodotti vegetali, necessarie ai fini della valutazione del rischio associato a tale tipologia di prodotti. Lo studio permetterà anche di valutare l'efficacia dei processi di disinfezione attualmente utilizzati prima del confezionamento nonché l'effetto di nuove tecnologie quali le alte pressioni sulla persistenza dei virus negli estratti e nei succhi di frutta sottoposti a tale trattamento

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di un metodo per il rilevamento di enterovirus utilizzabile a livello di autocontrollo e di controllo ufficiale.

Disponibilità di dati scientifici per la valutazione della efficacia delle tecniche di disinfezione attualmente utilizzate per la bonifica dei prodotti confezionati destinati al consumo diretto.

Valutazione di nuove tecnologie che possono essere utilizzate nella filiera produttiva dei succhi di frutta, quali le alte pressioni, ai fini della inattivazione dei contaminanti di origine virale

Ruolo dei biofenoli nel potenziamento delle difese antiossidanti della beta-cellula pancreatica nel diabete di tipo 2

I biofenoli, presenti naturalmente nei vegetali e frutta sono dei potenti antiossidanti. I biofenoli contenuti negli alimenti di origine vegetale si sono dimostrati capaci, fra l'altro, di inibire la ossidazione delle LDL, mediata da macrofagi murini, aumentando l'espressione degli enzimi glutatione-correlati oltre a potenziare l'attività della superossido dismutasi (SOD) e della catalasi (CAT). Il diabete di tipo 2, la cui incidenza sta assumendo proporzioni allarmanti, è associato a un elevato *stress* ossidativo dovuto a uno sbilanciamento tra la produzione di ROS e i sistemi antiossidanti cellulari. La iperglicemia e la iperlipidemia contribuiscono attraverso diversi meccanismi alle alterazioni beta-cellulari responsabili dell'insorgenza del diabete di tipo 2 e alle successive complicanze. Gli acidi grassi liberi (FFA) sono responsabili, quando cronicamente elevati, di alterazioni funzionali, aumento di *stress* ossidativo e morte per apoptosi della beta cellula. È stato dimostrato che isole pancreatiche umane di soggetti diabetici di tipo 2, dopo il trattamento, *in vitro*, con glutatione, mostravano una diminuzione di *stress* ossidativo che si associava a una ripresa della secrezione insulinica glucosio-indotta. L'intento del progetto è quello di individuare nei biofenoli potenti fattori antiossidanti capaci di proteggere la beta-cellula da insulti ossidativi contribuendo in tale modo a contrastare l'insorgenza di insulino-resistenza e di diabete di tipo 2.

Risultati attesi nel triennio

Lo scopo di questo progetto è quello di valutare eventuali effetti protettivi di biofenoli, e i possibili meccanismi d'azione coinvolti, nei confronti del danno indotto da acidi grassi liberi

(FFA) nella beta-cellula. A tale proposito sarà utilizzata la linea cellulare di ratto RINm5F insulino-secrente che è considerata un valido surrogato di beta-cellula pancreatica. Allo scopo di valutare gli effetti benefici di questi composti, le RIN m5F saranno incubate per 24-72h in presenza/assenza di FFA e specifici biofenoli. Saranno studiati l'apoptosi mediante la valutazione della fosfatidilserina (annessina V) e l'espressione di molecole ad essa correlate quali le molecole antiapoptotiche bcl-2 e bcl-xL e quelle proapoptotiche bax per valutare il coinvolgimento di questo *pathway* cellulare; considerando che la maggior parte dei ROS sono di derivazione mitocondriale, verranno valutati i livelli dei ROS (H₂O₂, O₂) e il potenziale di membrana mitocondriale; per valutare la risposta cellulare al danno FFA-indotto e all'azione antiossidante dei biofenoli sarà esaminata l'espressione e l'attività degli enzimi antiossidanti della beta cellula quali GSH, GPx, Catalasi; poiché gli FFA inducono alterazione della funzionalità insulinica, essa verrà studiata analizzando la secrezione insulinica glucosio-indotta e fattori molecolari coinvolti nella trasmissione del messaggio insulinico (PI3K/Akt, IRS-2, UCP-2). I risultati attesi da questo studio permetteranno di comprendere se, e con quali meccanismi di azione, i biofenoli naturali possono interagire nei processi cellulari dell'isola pancreatica diabetica "ricca" di ROS e con un debole sistema antiossidante.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto potrà fornire utili indicazioni sulla possibilità di utilizzare nuovi fattori, quali gli antiossidanti vegetali, per contrastare le disfunzioni e la morte della beta cellula che si osservano nel diabete di tipo 2. Lo studio permetterà, quindi, di programmare future strategie atte a prevenire o ritardare il danno ossidativo a cui è sottoposta la beta-cellula. Inoltre, poiché il danno da *stress* ossidativo è presente non solo nel diabete di tipo 2 ma anche nel diabete di tipo 1 è ipotizzabile che la dimostrazione dell'effetto antiossidante dei biofenoli possa essere sfruttato anche per potenziare la vitalità delle isole pancreatiche destinate al trapianto di isole nei soggetti affetti da DM1

Ruolo di componenti della dieta sulla funzionalità della cellula intestinale

Un'aumentata produzione di ROS, riconosciuti quali mediatori di infiammazione intestinale, con conseguente drammatica diminuzione delle difese antiossidanti cellulari sono caratteristici delle patologie infiammatorie intestinali o IBD. L'epitelio intestinale dato il suo ruolo di barriera tra ambiente esterno e interno dell'organismo, risulta essere il tessuto che per primo viene a contatto con le sostanze di origine alimentare e quindi quello maggiormente soggetto a una possibile azione tossica di queste. La presenza di diversi tipi di acidi grassi in alimenti, in particolare gli acidi grassi polinsaturi, data la presenza di doppi legami, risultano soggetti all'attacco di radicali liberi e quindi a fenomeni di ossidazione, con conseguente formazione di prodotti tossici quali idroperossidi, lipoperossidi e prodotti di lipoperossidazione terminali (aldeidi a catena corta) potrebbe contribuire al danno della mucosa intestinale. In corso di infiammazione, la morte cellulare dovuta ad aumentata produzione di ROS e di citochine infiammatorie, ad opera di macrofagi e leucociti può determinare compromissione della funzione di barriera e alterazione della funzione di assorbimento compromettendo la normale capacità di rigenerazione cellulare dovuta alla continua sostituzione di cellule dei villi da parte delle cellule indifferenziate delle cripte intestinali. Farmaci come il 5-ASA vengono utilizzati come terapia nelle IBD per le loro spiccate attività antiossidanti. Aumentare le difese antiossidanti cellulari con supplementazione dietetica con antiossidanti di origine vegetale può avere un ruolo importante nella prevenzione e un valido supporto terapeutico. Il progetto si propone di studiare, sia in termini di protezione dal danno ossidativo sia in termini di modificazioni funzionali della cellula intestinale, gli effetti di acidi grassi presenti negli alimenti

come grassi saturi, MUFA e PUFA (ω -3), nonché gli effetti protettivi dell'esposizione a antiossidanti vitaminici e fenolici.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone di individuare in modelli cellulari *in vitro*, le basi cellulari e molecolari dell'effetto di acidi grassi a diverso grado di saturazione e dei loro prodotti ossidati, nonché i meccanismi responsabili della protezione indotta dal potenziamento delle difese antiossidanti ottenuta esponendo le cellule a composti fenolici presenti negli alimenti di origine vegetale. A questo scopo verranno utilizzate colture di cellule intestinali umane Caco-2, differenziate e indifferenziate, le cui caratteristiche ne fanno un valido modello *in vitro* per lo studio di tutte quelle sostanze che vengono in contatto con l'intestino tenue e esercitano su questo il loro effetto. Su tale modello sperimentale verranno valutati, in particolare, l'induzione di morte cellulare per apoptosi e i meccanismi attraverso i quali essa si determina, e la capacità antiossidante cellulare dopo trattamento con lipidi a diverso grado di saturazione e polifenoli di origine alimentare. Lo studio sugli acidi grassi, in particolare sugli ω -3 con i quali diversi alimenti di uso comune vengono arricchiti, potrebbero definire il ruolo svolto da differenze qualitative della componente lipidica degli alimenti, sia in termini di induttori del danno, che di agenti protettivi.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio si propone di individuare in modelli cellulari *in vitro*, le basi cellulari e molecolari dell'effetto di acidi grassi a diverso grado di saturazione e dei loro prodotti ossidati, nonché i meccanismi responsabili della protezione indotta dal potenziamento delle difese antiossidanti ottenuta esponendo le cellule a composti fenolici presenti negli alimenti di origine vegetale. A questo scopo verranno utilizzate colture di cellule intestinali umane Caco-2, differenziate e indifferenziate, le cui caratteristiche ne fanno un valido modello *in vitro* per lo studio di tutte quelle sostanze che vengono in contatto con l'intestino tenue e esercitano su questo il loro effetto. Su tale modello sperimentale verranno valutati, in particolare, l'induzione di morte cellulare per apoptosi e i meccanismi attraverso i quali essa si determina, e la capacità antiossidante cellulare dopo trattamento con lipidi a diverso grado di saturazione e polifenoli di origine alimentare. Lo studio sugli acidi grassi, in particolare sugli ω -3 con i quali diversi alimenti di uso comune vengono arricchiti, potrebbero definire il ruolo svolto da differenze qualitative della componente lipidica degli alimenti, sia in termini di induttori del danno, che di agenti protettivi.

Sicurezza alimentare: studio e applicazione di misure di controllo utilizzando la tecnica *Real Time* PCR per valutare la presenza e il comportamento di patogeni alimentari in prodotti tradizionali italiani

L'analisi del rischio è il pilastro fondamentale per valutare la sicurezza d'uso degli alimenti e per definire interventi di politica-sanitaria mirati a ridurre il rischio a un livello accettabile.

L'analisi del rischio è una procedura molto complessa e interdisciplinare che è stata ben definita, in tutte le sue fasi, da importanti organizzazioni internazionali quali l'OMS e il *Codex Alimentarius*. Un primo approccio alla valutazione del rischio, una delle tre fasi in cui si articola l'analisi del rischio, è quello di attribuire differenti livelli di rischio in relazione alla combinazione tra pericolo microbiologico e alimento contaminato.

Tale classificazione viene normalmente effettuata in relazione alle conoscenze dei prodotti, dell'ecologia batterica e dei processi produttivi utilizzati.

In seguito a tali conoscenze si possono proporre modifiche dei processi produttivi per aumentare il grado di sicurezza degli alimenti, particolarmente di quelli destinati alle popolazioni più a rischio. Per l'acquisizione dei dati microbiologici utilizzabili per queste

valutazioni è necessario disporre di metodi analitici rapidi per valutare la prevalenza della contaminazione di alcuni patogeni in questi alimenti.

Risultati attesi nel triennio

Studio, messa a punto e standardizzazione di metodi di PCR *Real Time* per la valutazione qualitativa della presenza di *Listeria monocytogenes* sul DNA preceentemente estratto dalle matrici ambientali e alimentari selezionate. Durante il progetto saranno identificati e realizzati *primer* e sonde idonee all'applicazione della tecnologia Taqman, della tecnologia FRET e all'utilizzo del SYBR *Green* nello sviluppo di saggi PCR *Real Time*. Inoltre saranno sviluppati controlli positivi di amplificazione e saranno ottimizzate le condizioni di amplificazione in matrici diverse.

Trasferibilità dei risultati

La metodica in PCR -RT quantitativa renderà possibile a laboratori pubblici, servizi veterinari, stabilimenti di trasformazione degli alimenti di verificare la presenza dei patogeni e/o il rispetto dei limiti imposti dalla normativa europea negli alimenti *ready to eat* per taluni patogeni.

Speciazione dell'arsenico, del cadmio e del mercurio in prodotti della pesca e dell'acquacoltura

La dieta rappresenta la principale fonte di esposizione della popolazione generale a elementi tossici quali arsenico, cadmio e mercurio. Tuttavia gli effetti biologici di tali elementi dipendono strettamente dalla forma chimica in cui essi sono presenti nei prodotti alimentari. Questa influenza in modo decisivo l'assorbimento gastrointestinale, il destino metabolico e gli effetti avversi a carico dei diversi organi e apparati.

I prodotti ittici rappresentano una fonte alimentare di alto valore nutrizionale. Tuttavia alcuni organismi acquatici sono potenziali bioconcentratori di elementi in forme chimiche caratterizzate da elevata tossicità. Ad esempio nel caso del mercurio vi è bioaccumulo di metilmercurio, una specie chimica altamente tossica, in molte specie di pesci, in particolare predatori di dimensioni (età) elevate. Il progetto si propone di studiare la speciazione dell'arsenico, del cadmio e del mercurio in prodotti della pesca e dell'acquacoltura mediante metodi combinati, quali HPLC-ICP-MS, e LC-MS-MS. Particolare enfasi verrà posta sulle variabili biologiche, ambientali e tecnologiche (acquacoltura) che influenzano la speciazione di questi elementi nei prodotti ittici. Inoltre verrà indagato l'effetto delle comuni preparazioni domestiche di questi alimenti. Le informazioni ottenute verranno integrate con misure di bioaccessibilità (*in vitro*) per la caratterizzazione del potenziale assorbimento gastrointestinale nonché dei possibili effetti biologici *in vivo*.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione di prodotti ittici, specialmente di provenienza mediterranea, per garantirne la sicurezza d'uso sotto il profilo dell'assenza di elementi inorganici in forme chimiche tossiche. Individuazione delle variabili biologiche, ambientali e tecnologiche che influenzano il profilo bioinorganico dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura al fine di orientare le pratiche produttive verso l'ottenimento di alimenti genuini e sicuri.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto mira a identificare possibili fattori di rischio di natura chimica nella filiera della pesca e dell'acquacoltura. I risultati avranno quindi immediata trasferibilità nell'ambito della produzione ittica, specialmente a livello nazionale.

Stima dell'esposizione a elementi inorganici aventi rilevanza sotto il profilo tossicologico e nutrizionale attraverso la dieta in Italia

La dieta rappresenta la principale fonte di esposizione della popolazione generale a elementi tossici come piombo, cadmio, mercurio e arsenico. La stima dell'assunzione di tali elementi rientra nelle priorità individuate dalla Commissione Europea nell'ambito della cooperazione scientifica sulle questioni riguardanti gli alimenti. Essa deve avvenire su scala nazionale e rappresenta il prerequisito per una realistica caratterizzazione del rischio sulla base dei limiti cautelativi di assunzione fissati dai competenti organismi internazionali.

Il progetto si propone di valutare l'apporto dei singoli gruppi di alimenti e della dieta nel suo complesso all'assunzione di elementi tossici. A tal fine, sulla base dei dati sui consumi alimentari esistenti, verranno opportunamente campionati sul territorio nazionale e analizzati i prodotti che contribuiscono significativamente alla composizione della dieta media.

Oltre agli elementi di interesse tossicologico, verranno studiati alcuni elementi essenziali. Si perseguirà quindi un approccio integrato, tenendo conto che la gestione e comunicazione del rischio non possono prescindere da una visione consapevole dei benefici associati al consumo di determinati alimenti con particolare valenza nutrizionale. Nella valutazione del rapporto rischio/beneficio si terrà in debito conto il contributo di tali alimenti all'assunzione di nutrienti e agenti capaci di esercitare funzioni benefiche nell'organismo, a cominciare dai minerali essenziali.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di stimare l'assunzione attraverso la dieta di elementi inorganici aventi rilevanza sotto il profilo tossicologico (piombo, cadmio, mercurio, arsenico) e nutrizionale (ferro, rame, zinco, selenio). Particolare attenzione verrà dedicata alla valutazione dell'esposizione nei casi estremi e per gruppi di popolazione più sensibili, utilizzando idonei approcci metodologici. Ciò consentirà una realistica caratterizzazione del rischio e la conseguente possibilità di indirizzare opportunamente le scelte dei consumatori. Inoltre, verrà fissato un riferimento temporale in vista di future ripetizioni dell'indagine con una periodicità definita, secondo una opportuna logica di programmazione nel lungo periodo.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto mira a pervenire a una stima dell'esposizione che sia confrontabile con quelle condotte in altri paesi europei, pur nella varietà dei diversi approcci metodologici e dei conseguenti fattori di incertezza. Le indicazioni ottenute contribuiranno in modo concreto alla politica europea nel campo della sicurezza alimentare e, più in generale, della tutela della salute dei consumatori.

Studio sullo stato di contaminazione della fauna ittica del fiume Tevere nel tratto urbano di Roma

La ricerca è nata su invito del Comune di Roma, Assessorato Ambiente, per valutare la sanità e la salubrità della fauna ittica del fiume Tevere. Il problema, riportato con evidenza anche da alcuni organi di stampa, è legato al fenomeno della pesca illegale, effettuata dalle numerose piccole comunità, composte essenzialmente da extracomunitari, che vivono in condizioni precarie ma ormai stabilmente lungo le rive del fiume. Il pesce catturato oltre ad essere direttamente consumato, in alcuni casi sembra sia avviato alla vendita sempre a scopi alimentari al di fuori di qualsiasi controllo. Il fenomeno ha raggiunto dimensioni tali da poter costituire un fattore di rischio igienico-sanitario, seppure per una fascia ristretta della popolazione. Nonostante esistano diversi studi sull'inquinamento delle acque e dei sedimenti del Tevere, non sempre le informazioni disponibili possono essere direttamente riconducibili alla contaminazione della fauna ittica, poiché la biodisponibilità dei contaminanti chimici è

estremamente variabile e dipende da numerosi fattori. In questa prima indagine conoscitiva sono stati individuati i principali indicatori di contaminazione chimica in relazione alle diverse fonti di inquinamento del fiume Tevere: industriale, agricola e urbana. Gli indicatori previsti da ricercare nei tessuti di alcune specie ittiche sono gli elementi tossici in traccia (As, Cd, Cr, Hg, Pb), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), le diossine, i policlorobifenili, i ritardanti di fiamma e gli alchilfenoli.

Risultati attesi nel triennio

In questo studio saranno presi in esame alcune specie ittiche più significative della composizione della popolazione ittica del fiume e per il loro interesse di pesca. Per questi motivi la scelta è ricaduta sulle specie come la carpa (*Cyprinus carpio*), il caveano (*Leuciscus cephalus*), il cefalo (*Mugil cephalus*, *Liza ramada*), l'anguilla (*Anguilla anguilla*).

Ognuna di queste specie occupa un diverso livello trofico nel corso d'acqua e quindi presenta una differente esposizione ai contaminanti eventualmente presenti nell'ecosistema. La carpa è la specie più ricercata per il consumo alimentare da parte di numerosi cittadini extracomunitari. E, da una preliminare indagine, risulta un fenomeno di non piccole proporzioni. L'anguilla è la specie che interessa ancora la pesca da parte di alcuni gruppi di pescatori professionisti (gli ultimi fiumaroli del Tevere).

Il campionamento ittico verrà effettuato in tre differenti stazioni del braccio urbano del fiume (ponte Milvio, Trastevere, Magliana) e in due diversi periodi (primavera- inizio estate e fine estate-autunno). Questo per poter rilevare se intervengono variazioni nella concentrazione degli inquinanti nel fiume, e nei pesci, in relazione al periodo stagionale (primavera abbondanti piogge, fine estate periodo di siccità).

La conoscenza sul livello di contaminazione da metalli pesanti e altri elementi tossici in pesci del tratto urbano del Tevere appare utile non solo per la rilevanza prettamente sanitaria in considerazione del consumo alimentare, che è l'obiettivo fondamentale dello studio, ma può risultare di interesse anche per una valutazione eco tossicologica visti i recenti fenomeni di massicce morie di pesci accaduti in questi ultimi anni.

Trasferibilità dei risultati

L'impatto antropico che subisce il Tevere, soprattutto nel tratto urbano, è di notevoli proporzioni e ciò provoca dei cambiamenti, più o meno marcati, sui sistemi biologici, e sull'intera organizzazione dell'ecosistema fluviale. In questo ambito, i pesci possono assumere la funzione di sentinelle (bioindicatori) dei potenziali rischi, sia ecologici che per l'uomo, del degrado degli ecosistemi acquatici. Andando così a integrare gli indicatori chimici e microbiologici. La necessità di impiegare le comunità ittiche quali indicatori dello stato ambientale, è evidenziata anche dalla Dir (CE) 2000/60 relativa alla tutela delle risorse acquatiche. Le amministrazioni pubbliche che devono intervenire, a diversi livelli di competenza, nella gestione del fiume sono: Comune di Roma, Provincia, Regione, ARPA, Autorità di Bacino. Ognuna di queste amministrazioni ha la necessità di acquisire più dati possibili per orientare meglio i propri interventi pubblici.

L'obiettivo del presente studio è di rilevare la presenza di contaminanti chimici in alcune specie di pesci e valutare l'esposizione a queste sostanze nelle persone consumatrici di questi alimenti. Il controllo dei livelli di sicurezza di un prodotto alimentare, in relazione alla presenza di contaminanti chimici, è fondato sullo studio delle esposizioni della popolazione a queste sostanze. Queste informazioni, provenienti da dati scientifici, possono essere utilizzate dalle amministrazioni per poter attuare precisi programmi di prevenzione nell'ambito, ad esempio, della gestione delle risorse ittiche di interesse per l'attività di pesca a scopi alimentari e anche quali indicatori per una migliore gestione ambientale.

Sviluppo di immunosensori per la determinazione e quantificazione di batteri patogeni e loro tossine negli alimenti

Il consumo di alimenti conservati e preparati in condizioni non idonee rappresenta tuttora uno dei principali problemi di sanità pubblica, soprattutto in relazione alle malattie dovute alla presenza accidentale nei prodotti di microrganismi patogeni o di metaboliti tossici.

In alcuni casi si tratta di specie microbiche note da lungo tempo, in parte adattate ai nuovi processi tecnologici, o anche di vere e proprie specie emergenti. I test microbiologici convenzionali, basati sulla capacità dei microrganismi di svilupparsi e di formare colonie visibili, sono molto sensibili e economici ma richiedono successivi *step* culturali e necessitano di tempi di risposta a volte più lunghi della stessa *shelf-life* del prodotto stesso.

Con l'implementazione dei sistemi di autocontrollo, da parte delle industrie alimentari, è universalmente sentita la necessità di disporre di metodi di analisi semplici, rapidi e affidabili per accertare la presenza di batteri patogeni e loro tossine negli alimenti. In particolare, saggi che possano essere completati in pochi minuti o ore permetterebbero di adottare rapide azioni correttive in caso di positività. Alla luce di queste necessità negli ultimi anni accanto alle tecniche di biologia molecolare, che richiedono sofisticate apparecchiature, personale qualificato e almeno quattro differenti aree di lavoro, hanno avuto un notevole sviluppo le tecniche immunologiche che si basano sull'utilizzo dei biosensori.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo e validazione di immunosensori elettrochimici per la determinazione e quantificazione di: Salmonella, *Listeria monocytogenes* ed enterotossine stafilococciche,

I sensori elettrochimici monouso “*screen printed electrodes*” (SPEs), realizzati con tecnica di stampa serigrafica, modificati come immunosensori verranno utilizzati per la misura di tossine e di microrganismi patogeni direttamente nell'alimento. Saranno utilizzate a tal fine reazioni immunologiche sfruttando anticorpi specifici in grado di riconoscere e quindi di reagire selettivamente con le sostanze selezionate, qualora queste siano presenti nell'alimento.

Verranno utilizzati enzimi marcatori quali Fosfatasi Alcalina (AP), Perossidasi (HRP) e Glucosio Ossidasi (GOD) i cui prodotti di reazione possono essere misurati tramite tecniche di misura elettrochimica rapide e sensibili, come la voltammetria differenziale ad impulsi (DPV), la voltammetria ad onda quadra (SWV).

Infine tale tecnologia verrà associata all'uso del potenziostato PalmSens.

Prima dell'applicazione dei saggi immunoenzimatici a campioni reali verrà valutato l'effetto della matrice, al fine di valutarne l'eventuale presenza di interferenti nella matrice, e l'efficienza dell'estrazione dell'analita dal campione.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di tali metodiche rapide in sede di autocontrollo e controllo ufficiale e in occasione di emergenze sanitarie.

L'importanza delle tecniche che si basano sui biosensori, oltre a essere un'importante alternativa alle tecniche di biologia molecolare, è legata alla possibilità di sviluppare sistemi analitici da utilizzare direttamente sulle linee produttive allo scopo di analizzare in tempo reale lo stato di contaminazione delle produzioni alimentari.

Sviluppo di metodi *multi-screening* e di metodi innovativi per l'identificazione di OGM in vista del crescente numero di eventi autorizzati e non autorizzati in EU

In considerazione del crescente sviluppo e commercializzazione di piante geneticamente modificate a livello mondiale e in considerazione della diversificazione delle sequenze di regolazione e dei geni *marker* introdotti negli OGM di recente produzione, l'identificazione di

OGM in alimenti e mangimi necessita della messa a punto di nuovi metodi a integrazione di quelli attualmente disponibili; l'obiettivo è quello di mettere a punto metodi di *screening* capaci di evidenziare più eventi di modificazione in una unica fase sperimentale, utilizzando la tecnica dell'RFLP-PCR.

Inoltre, l'esperienza derivante dalla contaminazione accidentale da mais Bt 10 nella filiera alimentare, ha evidenziato che non è remota la possibilità di una presenza accidentale di OGM non autorizzati nei prodotti di importazione. È pertanto importante poter disporre di metodologie analitiche in grado di evidenziare la presenza di OGM non autorizzati in alimenti e mangimi. Non essendo disponibili in letteratura le sequenze del DNA specifiche per OGM non autorizzati è necessario utilizzare approcci alternativi di tipo probabilistico basati su metodi di *screening* e tecniche analitiche alternative come anchor PCR *fingerprinting* e sequenziamento.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione di metodi *multi-screening*

Sviluppo e validazione di protocolli analitici per l'analisi di OGM non autorizzati in EU

Realizzazione di una banca dati di sequenze relative a OGM non autorizzati

Trasferibilità dei risultati

Implementazione della diagnostica di OGM

Possibilità di attuare piani di monitoraggio e controlli ufficiali per la ricerca di OGM non autorizzati in EU

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 7 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

Le tossine botuliniche hanno assunto nuova importanza in tempi recenti: oltre ad essere la causa dei rari casi di botulismo umano che si verificano nel nostro Paese ogni anno, esse vengono utilizzate come farmaco nella terapia di sempre più numerose disfunzioni neuromuscolari, e sono state chiamate in causa come potenziali armi biologiche.

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 del 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 e pianificazione di attività mirate alla garanzia della competenza tecnica dei laboratori deputati al controllo ufficiale degli alimenti

A partire dal 2006 entrerà in vigore una serie di Normative della EC relative sia a nuovi criteri microbiologici da adottare a livello di produzione che di controllo sui prodotti alimentari nei diversi Stati Membri. A tale proposito si è sentita la necessità di una maggiore omogeneizzazione delle attività svolte nei diversi Stati Membri e ciò ha comportato l'individuazione, per diverse categorie di alimenti o parametri, di Laboratori di Riferimento sia Comunitario (LCR) che Nazionale (LNR), per svolgere un ruolo di indirizzo e coordinamento dei laboratori afferenti.

Tra i compiti di un LNR, in particolare, c'è quello di monitorare e assicurare la competenza tecnica dei laboratori del proprio Stato deputati al controllo ufficiale degli alimenti, mediante l'organizzazione di *Proficiency test* (PT). Nell'ambito del CNQARA operano il LNR per le contaminazioni batteriologiche e virali dei molluschi bivalvi e il LNR in materia di analisi e di prove sul latte e sui prodotti a base di latte. Lo scopo della presente proposta è lo sviluppo e la pianificazione di attività indispensabili ad assolvere tale compito secondo la ISO/IEC Guide 43-1:1997.

Tale attività prevee una serie di studi preliminari per la preparazione di materiale di riferimento che risponda a precise caratteristiche di omogeneità e stabilità, l'elaborazione di procedure relative alle modalità di trasporto e distribuzione dei campioni al fine di evitare danni o modificazioni nei campioni che possano inficiare il risultato e di appropriate tecniche statistiche dovranno essere elaborate e utilizzate e i risultati comunicati ai laboratori interessati assicurando la confidenzialità dei dati individuali.

Risultati attesi nel triennio

Definizione degli stabilizzanti, specifici per ogni analista, da utilizzare nei diversi *proficiencies*.

Attivazione di circuiti con la partecipazione di Laboratori periferici coinvolti nel controllo ufficiale, per la determinazione di alcuni parametri microbiologici (principalmente virus enterici, vibroni, flora batterica totale psicofila e mesofila, *L.monocytogenes*, *S.aureus* e relative tossine) nonché presenza di inibenti residui da trattamento veterinario per i prodotti alimentari delle rispettive competenze di entrambi i LNR

Trasferibilità dei risultati

Il coordinamento di questa attività da parte dei LRN permetterà di monitorare il livello di performance dei laboratori implicati nel controllo ufficiale, quando utilizzano metodi ufficiali. Saranno previsti *stage* per i laboratori a bassa *performance*.

La corretta esecuzione dei metodi ufficiali è inoltre la base di confronto per la validazione di metodi alternativi.

Sviluppo e validazione di metodiche analitiche basate su biosensori per la rilevazione e la determinazione di contaminanti chimici e residui in prodotti di apicoltura

L'importazione di miele in Italia copre più del 50% del fabbisogno nazionale, mentre la pappa reale consumata viene importata per la quasi totalità. Ciò fa sì che consistenti quantitativi di miele di provenienza estera, in prevalenza da paesi terzi, facciano ingresso ogni anno in Italia collocandola al quinto/sesto posto tra gli importatori mondiali di questo prodotto.

Negli ultimi anni l'apicoltura ha subito gli effetti dell'industrializzazione e dell'evoluzione della produzione agricola da cui può risultare una contaminazione dei prodotti da residui derivanti sia da sostanze utilizzate per la cura e la prevenzione di malattie dell'alveare, sia da antiparassitari usati in agricoltura e/o contaminanti di natura ubiquitaria, cui le api possono venire in contatto suggerendo il nettare dai vegetali.

Nonostante i prodotti di apicoltura rappresentino, mediamente, una quota trascurabile dei consumi alimentari nazionali, tali prodotti vengono largamente utilizzati, in virtù delle loro supposte proprietà energetiche e antibatteriche naturali, da fasce di popolazione protette (bambini, anziani, individui sottoposti a particolari *stress* oppure soggetti a situazioni patologiche varie) maggiormente soggette agli effetti tossici di taluni xenobiotici rispetto alla popolazione generale. È perciò importante prestare particolare attenzione ai residui nei prodotti di apicoltura destinati al consumo umano inclusi quelli d'importazione.

I prodotti di apicoltura infatti, sono compresi tra i prodotti di origine animale per i quali la direttiva 96/23/CE (U.E., 1996) prevede misure di controllo da parte degli Stati membri finalizzate alla ricerca di residui di farmaci veterinari e di agenti contaminanti.

Risultati attesi nel triennio

Gli attuali metodi analitici richiedono personale specializzato, strumentazione sofisticata, e quindi costosa, e lunghi tempi di analisi. La difficoltà nel controllo è dovuta soprattutto alla peculiare complessità della matrice; di qui la necessità di sviluppare metodi analitici alternativi per lo *screening* di un elevato numero di campioni in breve tempo e a basso costo. I biosensori rappresentano, in tal senso, un interessante approccio alternativo.

La ricerca si propone quindi, di sviluppare metodi analitici specifici, rapidi e affidabili, basati su biosensori e finalizzati al monitoraggio e/o al controllo della produzione nazionale ed estera di prodotti di apicoltura destinati al consumo umano.

A tale scopo saranno sviluppati biosensori costituiti da mediatori biologici accoppiati a un trasduttore elettrochimico non invasivo, cioè lontano dall'ambiente di misura che può talvolta presentare caratteristiche intollerabili di aggressività chimica (effetto matrice).

L'elevata sensibilità e la specificità sono ottenute mediante l'utilizzo di opportuni mediatori biologici e attraverso l'impiego di membrane polimeriche selettive mentre, le tecniche di misura elettrochimica (amperometria, e potenziometria) assicurano i vantaggi di economicità e di semplicità d'impiego.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo di biosensori consente la trasferibilità di metodologie validate, ad altre realtà operative di monitoraggio e di controllo, come i laboratori pubblici deputati al controllo

ufficiale degli alimenti, al fine di operare un miglioramento della sicurezza d'uso dei prodotti di apicoltura con conseguente aumento della fiducia del consumatore europeo nei confronti della catena di approvvigionamento alimentare.

Possibilità di applicazione delle metodiche analitiche sviluppate nei sistemi di autocontrollo (sistema HACCP) adottati in apicoltura.

Monitoraggio dei prodotti di apicoltura, mediante i metodi sviluppati, per la valutazione della qualità e sicurezza d'uso di miele, pappa reale e propoli, sia di produzione nazionale che importati da paesi UE o terzi, in termini di assenza di contaminanti chimici e/o residui di farmaci veterinari.

Tecnologie alimentari innovative e tutela della salute del consumatore

Le tecnologie di produzione degli alimenti, se utilizzate in modo intelligente, possono sicuramente rappresentare un potente ed efficace strumento d'intervento nella riduzione dei rischi d'insorgenza di malattie non trasmissibili e nella tutela e promozione della salute umana. L'evoluzione storica delle tecnologie alimentari considerava, in passato, la sola esigenza di conseguire l'obiettivo del processo senza considerare gli eventuali effetti negativi del trattamento. Attualmente, essendo la politica nazionale e europea in materia di alimenti sempre più orientata verso *standard* elevati di qualità e sicurezza, gli obiettivi desiderati devono essere conseguiti non solo minimizzando gli effetti negativi lungo tutta la filiera produttiva, ma potenziando ed esaltando valenze nutrizionali e/o funzionali positive. Tale sviluppo, che mira essenzialmente a un miglioramento della qualità alimentare e tecnologica e, nel contempo a una riduzione delle contaminazioni biologiche e chimiche, dirette e indirette, si realizza perseguendo continue innovazioni di sistema e di processo. Attualmente, tra le tecnologie emergenti, sono in sviluppo due grandi assi di ricerca tecnologica: i) l'applicazione sistematica dei controlli *on line* per la visualizzazione immediata del processo e del prodotto in ogni punto della linea di produzione; ii) l'ottimizzazione dei trattamenti termici o la loro sostituzione con tecnologie *mild*, la produzione e l'impiego d'ingredienti bioattivi, il miglioramento delle tecniche estrattive e l'innovazione degli imballaggi, che stanno sempre più diventando parte integrante del prodotto e non solo contenitori. Ciò premesso va considerato che le informazioni attualmente disponibili sul reale ruolo delle nuove tecnologie di produzione e conservazione sulla qualità e sicurezza dei prodotti alimentari sono spesso frammentarie se non del tutto carenti. A ulteriore aggravamento della situazione la circostanza che l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e lo sviluppo delle metodiche analitiche hanno messo alla luce nuove problematiche anche per le più vecchie e collaudate tecnologie di produzione. Esemplificativo a riguardo le tematiche relative alla contaminazione d'acrilammide e furani neoformati in alimenti cotti ad elevate temperature.

Risultati attesi nel triennio

Le ormai consolidate tecnologie volte a garantire la sicurezza degli alimenti salvaguardando il loro valore nutrizionale, sono oggi affiancate da tecniche più raffinate orientate a ottenere modificazioni mirate della materia prima, alla produzione di ingredienti bioattivi, all'eliminazione o riduzioni di contaminanti biologici e chimici, o all'arricchimento con composti dotati di valenze nutrizionali favorevoli. L'applicazione industriale di ogni novità esige, peraltro, una rigorosa valutazione che ne definisca in modo esatto fattibilità, validità, i vantaggi rispetto alle tecnologie esistenti, la sicurezza e i vantaggi in termini di apporto nutrizionale. Il presente progetto si propone di fornire dettagliate informazioni sull'influenza di tecnologie produttive emergenti sui fattori di rischio per la salute umana e sulle proprietà nutrizionali e funzionali degli alimenti. Allo scopo, saranno caratterizzati effetti desiderati come eliminazione o riduzione di contaminanti chimici e biologici, cambiamenti chimico-fisici

positivi, proprietà funzionali possibilità di ridurre l'impiego di additivi chimici, aumento della *shelf-life*, ecc. ed effetti indesiderati come neoformazione di composti tossici indesiderati, riduzione nella biodisponibilità di nutrienti e/o composti funzionali, ossidazioni, ecc. Inoltre, il progetto si prefigge di fornire indicazioni su eventuali modifiche e/o correttivi da applicare alle nuove tecnologie e di approntare linee guida per adeguamento dei piani HACCP di pertinenza. Infine, di fornire dati utili a dare sostegno all'elaborazione dei sistemi d'informazione e sensibilizzazione dei consumatori a tutela della loro salute.

Trasferibilità dei risultati

Gli esiti del progetto costituiranno un utile supporto informativo per tutti i soggetti coinvolti nella produzione, controllo e consumo degli alimenti ai fini di una sempre più incisiva e armonizzata opera di tutela e promozione della salute umana.

In particolare, tutte le informazioni acquisite saranno direttamente trasferibili a:

autorità governative per una più mirata individuazione delle priorità d'intervento e di destinazione dei fondi;

strutture del SSN centrali e periferiche per una migliore razionalizzazione dei controlli;

industrie alimentari per consentire l'adeguamento dei piani HACCP relativamente alle tecnologie alimentari emergenti oggetto di studio;

istituzioni e agenzie comunitarie e internazionali per fornire contributi conoscitivi utili per l'emanazione di linee guida, atti normativi, standard e indirizzi d'intervento;

consumatori per informarli e sensibilizzarli sull'importanza dell'impiego di tecnologie alimentari "intelligenti" a tutela della loro salute

Il ruolo dell'ISS quale organo tecnico-scientifico principale del SSN, le sue attività consolidate e collaudate di promozione e formazione, le collaborazioni, cooperazioni e attività internazionali costituiranno un presupposto fondamentale per un efficace e ampia trasferibilità dei risultati e dei prodotti. La compartecipazione della Federalimentare concorrerà a incrementare la diffusione dei risultati grazie alla sua capillare presenza sul territorio nazionale e alle interconnessioni in ambito comunitario e internazionale.

Tecnologie alimentari innovative e tutela della salute del consumatore - "U.O. 5 organismi geneticamente modificati e xenobiotici di origine fungina"

La correlazione tra livelli di micotossine e tecnologia è particolarmente rilevante se si considera che è estremamente difficile eliminare completamente questi xenobiotici nella produzione primaria, ed è pertanto necessario avere sia una conoscenza esaustiva dell'effetto del processo tecnologico sulla loro concentrazione, sia studiare modelli innovativi di decontaminazione. Il presente progetto intende pertanto studiare la correlazione tra tecnologia e livelli di micotossine nel caso delle produzioni di oli vegetali.

Risultati attesi nel triennio

Ottenere informazioni sull'effetto dell'estrazione meccanica di oli di origine vegetale, in quanto tale processo può avere l'effetto controproducente di veicolare nella materia grassa estratta le micotossine presenti nella materia prima di partenza. La ricerca si propone di verificare il grado di veicolazione delle micotossine su varie tipologie di oli di origine vegetale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno presentati e divulgati attraverso pubblicazioni scientifiche e nell'ambito di Convegni

TRUEFOOD (Cali identifier: "FP6-2004-FOOD-3-A" 016264-2 "TRUEFOODn) WP2 Microbial Safety task 2.1 Innovation for improving microbial safety of traditional food products of animal origin subtask 2.1.1 Effect of feeding regimes and other

management practices on a) the incidence of mastitis, b) the level of veterinary antibiotic use and c) the level of antibiotic resistance in faecal *E.coli* and teat associated *S.aureus* and *S.agalactiae*

Gli attuali sistemi di allevamento animale traggono forte vantaggio dall'impiego di farmaci. Gli antibiotici controllano le infezioni batteriche e ne prevengono la diffusione tra gli animali. Le mastiti sono la più diffusa e costosa affezione delle lattifere. Il trattamento, basato sull'uso massiccio di antibiotici, causa forti problemi di residui e di antibiotico-resistenza oltre a ingenti perdite di produzione. Per tentare di ridurre l'uso degli antibiotici, verrà studiata la possibilità di utilizzo di olii essenziali a forte attività antistafilococcica (*Melaleuca alternifolia* e suoi componenti) nell'allevamento di animali da latte (bovini, ovini, caprini e bufalini). Verranno studiati: incidenza, severità e durata delle mastiti osservate rispettivamente nei gruppi trattati e in quelli di controllo durante la sperimentazione; la composizione della flora batterica nei diversi latti provenienti dai due gruppi a confronto; le specie batteriche effettivamente responsabili delle mastiti nelle diverse specie animali; le sensibilità della flora totale a diversi antibiotici utilizzati in veterinaria, con valutazione genotipica e fenotipica; la possibilità di resistenza crociata degli olii essenziali con altre molecole antibatteriche; i marcatori chimici per gli studi di deplezione in funzione dei diversi modi di utilizzo (esterno-intramammario) e in questo caso la valutazione del passaggio dai quarti trattati a quelli non trattati; l'effetto di eventuali residui sui processi di caseificazione.

Risultati attesi nel triennio

Aquisizione di dati sulla reale efficacia d'uso della *Melaleuca alternifolia* ai fini di una possibile riduzione delle quantità di antibiotici utilizzati nelle produzioni animali e quindi della pressione di selezione per la antibiotico resistenza. Sarà valutata anche la possibile azione sinergistica di tali principi antibatterici con gli antibiotici tradizionalmente utilizzati nel settore, per definire nel caso, almeno la possibilità di ridurre i dosaggi normalmente utilizzati nei trattamenti

Trasferibilità dei risultati

Definizione di un protocollo per l'utilizzo di molecole antibatteriche di natura non antibiotica da utilizzare negli allevamenti di animali destinati alla produzione di latte, per la prevenzione e/o il trattamento delle mastiti al fine di contribuire alla sostituzione totale o parziale degli antibiotici attualmente utilizzati

U.O. nell'ambito del progetto "Analisi del rischio sanitario nel pesce e nei molluschi di allevamento" (IZS-Roma)

Il progetto si propone il miglioramento della gestione sanitaria dei prodotti ittici di allevamento mediante l'acquisizione di dati quali-quantitativi per l'identificazione e la caratterizzazione dei pericoli ai fini di una valutazione del rischio. In particolare l'U.O. effettuerà studi per l'elaborazione di metodiche avanzate (PCR classica e *Real time* ecc., per la ricerca di germi patogeni (salmonelle, listeria, vibrioni) da utilizzare per valutare l'incidenza di tali microrganismi nelle diverse specie ittiche di allevamento e nei molluschi bivalvi, anche in relazione alle diverse tipologie di allevamento.

Verrà valutata anche la contaminazione chimica e verranno forniti dati su deplezione e accumulo di farmaci veterinari antibatterici (chinoloni, macrolidi, sulfamidici ecc.) nei tessuti edibili di specie ittiche (trote orate spigole, anguille). Si procederà allo sviluppo e validazione di sistemi integrati - metodi di *screening*, *post-screening* e conferma- per la ricerca e determinazione di residui di farmaci veterinari ad azione antibatterica. Verranno inoltre sviluppati e validati metodi analitici per la determinazione e speciazione di elementi in traccia nutrizionalmente significativi e/o tossicologicamente rilevanti. Si procederà quindi alla

valutazione dell'influenza dei processi tecnologici di produzione su tali contaminanti e alla stima dell'esposizione al rischio conseguente all'ingestione di prodotti contaminati.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità di metodologie avanzate per la ricerca di patogeni classici ed emergenti.

Raccolta e produzione di dati sulla presenza di germi patogeni e di residui di farmaci ad attività antibatterica in prodotti d'acquicoltura. Accertamento degli intervalli di concentrazione di elementi in traccia in tali prodotti.

Trasferibilità dei risultati

Uso delle informazioni ottenute per valutazioni tossicologiche o nutrizionali e per la formulazione di possibili indicazioni normative.

U.O. nell'ambito del progetto "Valutazione di differenti condizioni di depurazione nei confronti di patogeni emergenti" (IZS-Brescia)

I microrganismi patogeni che possono essere trasmessi all'uomo dai molluschi bivalvi, hanno notoriamente un comportamento diverso durante il processo di depurazione a cui tali prodotti vengono sottoposti prima della commercializzazione. Scopo del presente progetto è quello di valutare l'effetto della depurazione in molluschi contaminati da patogeni emergenti, quali virus enterici e vibriani.

Verranno presi in considerazione i *Calicivirus*, che rappresentano la maggiore causa di gastroenteriti in Europa; come modello verrà utilizzato il calicivirus felino che presenta diverse analogie con l'umano e rispetto a quest'ultimo il vantaggio di essere coltivabile su colture cellulari.

Per quanto riguarda i vibriani patogeni, verrà utilizzato il *Vibrio vulnificus*, componente della flora autoctona marina e responsabile di gravi patologie nell'uomo.

Le prove verranno condotte su molluschi, contaminati *in vivo* con quantità note di *Calicivirus felino* e di *V.vulnificus*, utilizzando un impianto di depurazione pilota ad acqua ozonizzata a diverse condizioni di temperatura e salinità.

Risultati attesi nel triennio

Indicazioni sulla possibilità di depurazione di molluschi contaminati da virus enterici e batteri patogeni emergenti.

Acquisizione di conoscenze sulle condizioni di salinità, temperatura e tempi da adottare in modo da rendere efficaci i trattamenti di depurazione dei molluschi in modo da garantire la qualità igienico microbiologica di tali prodotti alimentari.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti possono essere utilizzati per la modifica e il miglioramento di normative nazionali e comunitarie nel settore dei prodotti della pesca

Validazione di metodiche analitiche per la determinazione quantitativa di eventi di trasformazione di varietà di mais autorizzati nell'Unione Europea. Progetto di ricerca corrente del Ministero della Salute

Validazione di metodi analitici in PCR *real time* per la determinazione quantitativa dei mais MON810, Bt11 e T25.

Verifica della riproducibilità dei metodi.

Armonizzazione di impiego di tali metodi da parte dei laboratori deputati al controllo ufficiale sul territorio nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Saranno resi disponibili metodi analitici in PCR *real time* per la determinazione quantitativa specifica del mais MON810, Bt11 e T25, con relativi rapporti di validazione e Procedure Operative *Standard*. Al termine del progetto i metodi validati potranno essere accreditati secondo le norme ISO/IEC/EN 17025 e applicati alle prove ufficiali per la determinazione quantitativa di OGM nella filiera produttiva agro-alimentare ai fini della verifica dell'ottemperanza alla normativa comunitaria (Reg. CE 1829/2003 e 1830/2003) di prossima applicazione.

Trasferibilità dei risultati

Nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti, la validazione e la successiva divulgazione delle metodiche analitiche quantitative rappresenterà un progresso nell'armonizzazione della diagnostica attualmente utilizzata dalle differenti strutture preposte al controllo ufficiale degli alimenti. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, in qualità di Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca di OGM di concerto con l'Istituto Superiore di Sanità trasferirà le Procedure Operative *Standard* e i rapporti di validazione ai laboratori ufficiali del SSN. Inoltre fornirà supporto tecnico-scientifico agli stessi laboratori ai fini della corretta applicazione dei metodi.

Validazione di piani di campionamento per la determinazione quantitativa di OGM e metodiche analitiche per verificare che i materiali di riferimento certificati gravimetricamente sulla base del rapporto massa/massa (CRM) siano certificabili relativamente alla "percentuale delle copie di DNA geneticamente modificato rispetto alle copie di DNA specifico del taxon bersaglio, calcolata in termini di genomi aploidi" in accordo con quanto esplicitamente indicato nella raccomandazione 2004/787 CE

Nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti, in base alle recenti normative comunitarie, è di fondamentale importanza la validazione di metodi di analisi ai fini dell'accreditamento delle strutture deputate al controllo. In tale ambito verranno realizzati studi di validazione e *proficiency testing* al fine di implementare e armonizzare le attività di controllo sulla presenza di OGM in alimenti e mangimi.

La normativa comunitaria 2004/787 definisce in maniera dettagliata il protocollo di campionamento da utilizzare per prodotti agricoli sfusi, mentre per il campionamento di lotti di alimenti e mangimi preconfezionati indica unicamente di riferirsi alla norma ISO 2859. In generale questa norma è stata concepita essenzialmente per l'assicurazione del controllo di qualità nelle aziende produttrici (collaudo) e pertanto effettua numerose distinzioni a seconda del livello di qualità che si vuole raggiungere (livello di qualità accettabile e qualità limite) ed è generica per qualunque tipo di analita. Si rende quindi necessaria la verifica dell'applicabilità di questa norma al campionamento di prodotti per l'analisi di OGM.

Risultati attesi nel triennio

Validazione di metodiche analitiche per l'analisi di OGM.

Implementazione della normativa sul campionamento

Trasferibilità dei risultati

L'evoluzione della normativa specifica ha comportato la necessità di un adeguamento della relativa diagnostica; nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti, la definizione di piani di campionamento affidabili e praticabili, e la validazione delle metodiche analitiche rappresenta un progresso dell'armonizzazione nella diagnostica attualmente utilizzata dalle differenti strutture preposte al controllo ufficiale degli alimenti.

Valutazione del beneficio correlato all'assunzione di oli extra vergine di oliva e suoi derivati, in relazione alla biodisponibilità dei principali componenti fenolici

La dieta Mediterranea, basata sul consumo di alimenti caratterizzati da un elevato contenuto di vitamine e di composti fenolici ad attività antiossidante, esercita effetti protettivi nei confronti della malattia coronarica e di alcuni tipi di cancro. In aggiunta alla loro azione antiossidante, i polifenoli possono stimolare le difese antiossidanti endogene, inibire la sintesi e l'attività di citochine ed enzimi coinvolti nei processi infiammatori, inibire l'aggregazione piastrinica e l'attivazione metabolica di procarcinogeni.

La loro attività è legata all'assorbimento attraverso le membrane plasmatiche, ma poco si sa dell'assorbimento intestinale, metabolismo e biodisponibilità. Inoltre la loro struttura chimica condiziona l'assorbimento nonché i loro meccanismi d'azione. L'olio di oliva presenta una grande variabilità, sia quantitativa che qualitativa, di composizione in polifenoli che dipende dal cultivar e dalle modalità di raccolta ed estrazione delle olive. Oli extra vergine di oliva possono essere molto diversi fra loro in termini di potere antiossidante e di attività biologiche.

Il progetto si prefigge di acquisire, attraverso studi *in vivo* e *in vitro*, nuove conoscenze sugli effetti benefici del consumo di olio extra vergine di oliva correlandoli alla capacità di assorbimento e metabolismo dei principali biofenoli in esso contenuti. Inoltre la comparazione degli effetti di oli diversi per qualità e quantità dei biofenoli contenuti, nonché per diverso potere antiossidante totale, permetterà di valutarne la reale efficacia protettiva nei confronti di specifiche attività cellulari coinvolte nella patogenesi del danno vasale arteriosclerotico.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio *in vivo* si propone di comparare gli effetti del consumo di olio extra vergine di oliva a contenuto elevato di fenoli e di un integratore ricco in fenoli, da soli o in combinazione, rispetto a quelli dell'olio di oliva, in pazienti dislipidemici e in sovrappeso, e in controlli sani, su alcuni parametri indicatori di stress ossidativo e di infiammazione (PAO; oxLDL circolanti; ossidabilità delle LDL; vitamina E e carotenici; isoprostani urinari; proteina e mRNA di IL8, IL6, IL1b, IL10; GSH plasmatico e eritrocitario). L'assorbimento dei principali polifenoli sarà valutato attraverso dosaggio urinario.

Lo studio *in vitro* sarà condotto su cellule Caco-2 differenziate, considerate un buon modello di assorbimento intestinale, al fine di individuare la capacità di uptake, i meccanismi di trasporto coinvolti (SGLT1, MRP2 ecc.), le vie metaboliche attivate (saggi della beta-glucosidasi, della beta-glucuronidasi, della solfatasi). Si testeranno singoli biofenoli nonché combinazioni di essi al fine di valutare eventuali fenomeni di sinergismo o di inibizione competitiva.

Infine il trattamento di cellule macrofagiche murine e umane con estratti di polifenoli derivanti da oli extra vergini di oliva, caratterizzati con chemiluminescenza rispetto al loro potere antiossidante totale, permetterà di valutarne gli effetti su specifiche funzioni cellulari coinvolte nella formazione della placca ateromatosa come l'ossidazione cellulo-mediata delle LDL e l'*uptake* di LDL ossidate attraverso recettori scavenger, evento precoce nella formazione di *foam cells*.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto rappresenta un'opportunità per approfondire la valutazione del rischio nutrizionale degli alimenti e la prevenzione delle patologie ad esso correlate (obesità, malattie cardiovascolari e diabete), le quali rappresentano un importante problema sanitario con costi socio-economici gravi a carico del SSN. Dallo studio *in vivo* si attendono risultati utili alla definizione della reale efficacia del consumo sia di normali quantità di olio extra vergine di oliva, che di nutraceutici, nei confronti di alterati processi ossidativi e infiammatori presenti spesso nei soggetti con alterazioni del metabolismo lipidico e in sovrappeso. Lo studio *in vitro*

permetterà di correlare gli effetti di polifenoli contenuti negli alimenti su attività cellulari specifiche, con la biodisponibilità e il loro effettivo potere antiossidante (POA), valutando di conseguenza il reale valore nutrizionale di alimenti che possono differire nel loro contenuto di nutrienti funzionali, e fornendo nuove indicazioni per l'ottimizzazione delle procedure di produzione.

Valutazione del consumo di integratori alimentari e individuazione dei fattori associati al loro utilizzo

Negli ultimi anni nei paesi industrializzati il consumo di integratori alimentari, in particolare di quelli contenenti ingredienti erboristici, è cresciuto a ritmi elevati nonostante la mancanza di consenso da parte della Comunità Scientifica rispetto alla opportunità di promuovere un loro uso diffuso a livello di popolazione. In diversi paesi sono stati condotte indagini per raccogliere informazioni sulla entità del fenomeno, sul tipo di integratori consumati con maggiore frequenza e sulle caratteristiche dei soggetti che assumono abitualmente questi preparati. Da tali studi è emerso che una notevole percentuale della popolazione adulta assume almeno un integratore alimentare, con prevalenza di quelli vitaminico-minerali, e che il loro consumo è spesso associato a determinate variabili demografiche e socioeconomiche e a specifici stili di vita. Risulta quindi di particolare interesse ottenere informazioni sulla diffusione e sulle caratteristiche di questo fenomeno anche nel nostro Paese. A tale scopo verrà formulato un questionario postale auto-compilato, da inviare a un numero significativo di soggetti rappresentativo della popolazione, per raccogliere informazioni sull'entità del consumo, sulle tipologie di integratori assunti, con particolare attenzione a quelli a base di piante, e sulle variabili eventualmente associate al loro utilizzo.

Risultati attesi nel triennio

Il questionario verrà strutturato in modo da ottenere informazioni su:
tipologia del/degli integratori consumati
frequenza di utilizzo
segnalazioni di eventuali effetti avversi
caratteristiche demografiche e socioeconomiche (età, sesso, livello culturale, ecc.) e stili di vita (abitudine al fumo, attività fisica, modelli alimentari ecc.) dei consumatori
stato di salute
motivazioni dell'uso e fonti di informazione

L'elaborazione statistica delle informazioni raccolte consentirà di ricavare dati di consumo, sia complessivi che per tipologia di prodotto, e di evidenziare eventuali associazioni tra questi dati e specifiche caratteristiche dei consumatori. Verranno inoltre indagate le motivazioni che spingono i consumatori ad assumere questi prodotti e valutata l'influenza delle fonti di informazione su questo tipo di comportamento (mass media, pubblicità, suggerimenti medici ecc.).

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni ricavate dal progetto potranno essere condivise con tutti i soggetti coinvolti nella produzione, valutazione e utilizzo degli integratori alimentari (autorità centrali e operatori del SSN, comunità scientifica, industrie produttrici, consumatori) attraverso pubblicazioni scientifiche, seminari, comunicazioni a congressi, informazioni sul sito *web* del Centro.

I dati resi disponibili potranno essere utilizzati per la formulazione di politiche di controllo e di tutela della salute più efficaci e per fornire informazioni più mirate ai consumatori.

Valutazione dell'impatto sanitario delle micotossine sulla popolazione italiana

Le micotossine sono una categoria di contaminanti ad elevato impatto sulla salute umana e animale. L'ingestione attraverso gli alimenti è la tipologia di esposizione più comune, anche se è possibile l'esposizione tramite inalazione di polveri contaminate. Queste tossine sono attualmente considerati dall'UE fra le priorità per la sicurezza alimentare. Gli studi finora svolti hanno dimostrato la loro presenza in molte tipologie di alimenti. Inoltre, tramite studi sui biomarcatori, è stata verificata la presenza di una di queste tossine (ocratossina A) nel siero della popolazione e nel latte materno, a livelli di gran lunga superiori a quelli massimi tollerabili. A livello nazionale non è ancora stata effettuata la valutazione del rischio in maniera attendibile, completa e statisticamente significativa in quanto mancano dati di contaminazione statisticamente rappresentativi sia delle tipologie di alimenti che dei consumi alimentari. Inoltre i dati di incidenza di contaminazione disponibili sono stati elaborati finora con metodi deterministici, fornendo pertanto solo risposte parziali; sarebbe invece necessario produrre dati aggiornati e attendibili da elaborare con i moderni approcci di tipo probabilistico (metodo Montecarlo) che consentono di acquisire informazioni più dettagliate e esaustive sulla esposizione alle micotossine anche da parte di gruppi di popolazione specifici (bambini, vegetariani e celiaci).

Parallelamente alla valutazione del rischio effettuata con la valutazione dell'esposizione si effettuerà la valutazione del rischio tramite studi epidemiologici che correlino l'esposizione alle tossine con le relative malattie (danno epatico, renale e immunosoppressivo).

Risultati attesi nel triennio

L'acquisizione di una banca dati di incidenza di contaminazione ottenuta con una programmazione dei prelievi dei campioni delle matrici alimentari maggiormente suscettibili di contaminazione alle varie micotossine su basi statistiche (previa formulazione di modelli di campionamento su dove, come e perché prelevare i campioni)

Valutazione dell'esposizione del consumatore e di gruppi di consumatori alle varie micotossine tramite l'elaborazione dei dati di incidenza di contaminazione e di consumi alimentari ottenuta con due diversi approcci (deterministico e probabilistico), includendo la possibilità di esposizione a varie micotossine contemporaneamente.

Valutazione della esposizione tramite l'approccio della dieta totale. Verranno formati campioni che cumulino i vari tipi di alimenti e che rappresentino sia le diete tipiche italiane per le varie regioni, che diete idonee a specifici gruppi di popolazione. In particolare tramite la formulazione di diete totali specifiche destinate alla prima infanzia si otterranno informazioni sulla esposizione alla micotossine da parte di questo gruppo vulnerabile di popolazione.

Valutazione della esposizione tramite l'analisi della presenza di biomarcatori delle micotossine nei fluidi e tessuti biologici umani (latte, sangue, urine, materiale autoptico) per effettuare valutazioni epidemiologiche a medio e lungo termine di effetto dose-risposta sull'uomo.

Valutazione del rischio per le varie micotossine tramite correlazioni epidemiologiche sulla popolazione totale e su gruppi di popolazione (vegetariani, celiaci, nefropatici, alcolisti da vino) tra ingestione di micotossine e comparsa delle più importanti malattie correlate.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto prevede ricadute correlabili alla valutazione del rischio quale supporto alla gestione e alla comunicazione del rischio. In particolare

Gli studi di incidenza di contaminazione forniranno un monitoraggio della situazione italiana sia dei prodotti di importazione che di produzione nazionale. Il monitoraggio è rilevante sia ai fini delle opzioni del controllo ufficiale sia per quelle relative a vari altri settori della gestione del rischio con particolare riferimento alla prevenzione sul campo. I risultati del monitoraggio

saranno inoltre di supporto alla normativa che pur se emanata in modo abbastanza esaustivo richiede affinamenti per poter tener anche conto delle rilevanti implicazioni economiche del problema.

Gli studi di valutazione del rischio saranno utili alla gestione del rischio per poter effettuare una prioritizzazione dei rischi connessi agli alimenti e per le necessarie opzioni di prevenzione

La valutazione del rischio correlabile alle micotossine dovrà essere trasferita alla comunicazione del rischio; in particolare dovrà essere effettuata una diffusione del problema alla classe medica che ancora non considera il problema fra le priorità fra i rischi alimentari; analoga ricaduta potrà averci sul consumatore che attualmente effettua le sue scelte di tipologia di produzione (convenzionale, biologica e biotecnologica) senza tener in considerazione la diversa incidenza di contaminazione da micotossine nei tre diversi tipi di coltivazione agricola

Valutazione dell'influenza di alcuni elementi presenti nelle acque minerali naturali sull'intake totale giornaliero

Le acque minerali sono una preziosa fonte di principi nutritivi, non solo per l'acqua, ma soprattutto per i sali in essa presenti. Le loro caratteristiche sono legate al ruolo che gli ioni inorganici in esse contenute svolgono e dipendono quindi dalla specifica composizione di ciascuna acqua. Avremo quindi acque con contenuto di sali elevato, medio e basso, con contenuti di "macroelementi" (presenti nell'ordine del grammo) e "oligoelementi" (presenti nell'ordine del milligrammo). Molto importanti risultano le azioni degli elementi in tracce (oligoelementi) presenti nelle acque minerali, si ritiene che tali ioni agiscano come biocatalizzatori a livello cellulare favorendo con la loro presenza le attività enzimatiche delle cellule. Alcuni elementi non vengono normalmente riportati in etichetta in quanto sostanze non caratterizzanti l'acqua minerale. Scopo del presente lavoro sarà quello di valutare l'assunzione di alcuni elementi la cui entità è *border-line* tra rischio e beneficio in particolar modo in fasce di popolazione per i quali un consumo eccessivo di tali acque potrebbe presentare un fattore di rischio (gozzo, fluorosi ecc.). I dati analitici di Fluoro, Bromo, Iodio, Cromo e Alluminio, relativi ai contenuti nelle acque minerali naturali, verranno estrapolati dalle analisi ufficiali complete, che annualmente le aziende imbottigliatrici debbono presentare agli organi di controllo di competenza.

Risultati attesi nel triennio

Saranno presi in esame alcuni ioni quali: Fluoro, Bromo, Iodio, Cromo e Alluminio, costituenti delle acque minerali naturali presenti sul mercato nazionale, e verrà valutato il contributo dato dall'acqua minerale all'assunzione giornaliera totale di tali elementi rapportando il tutto al fabbisogno secondo i LARN (Livelli di Assunzione Raccomandati in Nutrienti). Prendendo come riferimento i Livelli Massimi Tollerabili proposti dall'Agenzia Europea sulla Sicurezza Alimentare (EFSA) si valuterà se questi composti, ingeriti in quantità maggiore, potrebbero costituire un fattore di rischio per la salute di particolari fasce di popolazioni.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni derivanti dal progetto potranno essere condivise:

- con tutti i soggetti coinvolti nella ricerca e nell'utilizzo di nuove sorgenti di acque minerali;
- con gli organi di controllo per una più accurata valutazione degli *intake* di particolari elementi sensibili.

I risultati ottenuti potrebbero essere utili per una riformulazione dell'etichetta delle acque minerali, esplicitando possibili avvertenze d'uso.

Valutazione della contaminazione da residui di trattamenti di antibiotici in miele destinato al consumo

In apicoltura, il trattamento di alcune patologie batteriche (peste americana ed europea, varroasi, ecc.) può avvalersi dell'uso di alcuni antibiotici. Nell'EC, l'impiego degli antibiotici in apicoltura è vietato, sia a titolo preventivo che terapeutico, mentre nei paesi che non rientrano nella CE, la situazione è estremamente eterogenea. Negli USA e in Australia, il trattamento antibiotico delle colonie a titolo preventivo è addirittura prassi normale. In quelle aree di produzione si è quindi innescato un circolo vizioso con indebolimento delle colonie aviarie, necessità di trattamenti sempre più ripetuti, insorgenza di resistenza alle tetracicline dell'agente eziologico (*Paenibacillus larvae*). Circa la metà dei mieli consumati in Europa provengono da paesi terzi. Il livello dei residui da trattamento veterinario è regolato dal Regolamento (CEE) n. 2377/90 che stabilisce una lista di valori per le specie animali maggiori ma che tuttavia non ha ancora definito i valori per le specie minori (le api sono tra queste). Nonostante inoltre miele sia anche considerato una matrice naturale per la quale non dovrebbe quindi essere ammesso alcun tipo di residuo, sono sempre più frequenti le segnalazioni di campioni positivi per la presenza di antibiotici e cloramfenicolo (quest'ultima sostanza in Allegato 4-Reg.CEE 2377/90 e quindi bandito in EU). Lo scopo della presente proposta è un'indagine per la valutazione della contaminazione dei mieli in commercio sul territorio italiano

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone di costituire una banca dati per la valutazione della contaminazione da antibiotici nel miele commercializzati in Italia e la messa a punto di metodiche di *screening* rapide per il monitoraggio.

Trasferibilità dei risultati

La definizione degli MRL per le specie minori è un processo estremamente lento. Questi dati, incrociati con dati di consumo per le diverse fasce di età potrebbero contribuire alla valutazione degli MRL per alcuni antibiotici utilizzati per questa matrice, contribuendo a ridurre questa carenza legislativa.

Valutazione della persistenza e della resistenza termica di *Enterobacter sakazakii* in prodotti destinati all'infanzia. Confronto tra metodiche classiche e innovative per la determinazione del microrganismo

Di recente *Ent. sakazakii*, un bacillo Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è stato associato a casi di infezione, piuttosto gravi, in neonati alimentati con latte in polvere contaminato. Quest'ultimo, infatti, è un prodotto non sterile in grado di supportare molto bene la crescita batterica. Nonostante i dati in letteratura riportino bassi valori di contaminazione nel prodotto finito, è pur vero che quest'ultimo subisce una manipolazione a livello domestico e ospedaliero, che in taluni condizioni può provocare un considerevole aumento della carica microbica iniziale fino al valore della dose infettante.

Nasce quindi, la necessità di valutare come fattori quali la temperatura e il tempo possano incidere sulla sopravvivenza e sulla crescita di *Ent. sakazakii* nel tipo di prodotto considerato, mantenuto in diverse condizioni ambientali.

Nello specifico, lo studio in oggetto si prefigge lo scopo di monitorare la persistenza di *Ent. sakazakii* in diverse tipologie di latte in polvere sperimentalmente contaminato, conservato a diverse temperature (temperatura ambiente e temperatura di frigorifero) e analizzato a differenti intervalli di tempo; nonché di valutarne la resistenza termica. Per la ricerca e la numerazione di *Ent. sakazakii* verranno utilizzati parallelamente metodi di microbiologia classica e di biologia molecolare, per poter effettuare anche un confronto tra le tecniche e valutare quale tra quelle usate presenta la miglior performance.

Risultati attesi nel triennio

Ricerca e numerazione di *Ent. sakazakii* mediante i metodi di microbiologia classica: Norma ISO 22964:2005; Norma ISO 21528-1:2000; Norma ISO 21528-2:2004; metodica FDA.

Identificazione genotipica mediante Polymerase Chain Reaction e Pulsed Field Gel Electrophoresis.

Valutazione della persistenza di *Ent. sakazakii* nel latte in polvere sperimentalmente contaminato e mantenuto alle diverse temperature e per i tempi considerati (valutazione sia sul prodotto polvere che sul prodotto opportunamente ricostituito).

Valutazione della resistenza termica di *Ent. sakazakii* nel latte sperimentalmente contaminato e opportunamente ricostituito con acqua a differenti temperature.

Valutazione della performance dei metodi utilizzati.

Trasferibilità dei risultati

Formulazione di linee guida, utili sia a livello produttivo che a livello domestico e ospedaliero, circa la corretta conservazione e manipolazione del latte in polvere per l'infanzia.

Aggiornare la letteratura scientifica riguardante l'*Ent. sakazakii*, con nuovi dati sperimentali.

Valutazione dell'attività antimicrobica di alcuni oli essenziali rispetto a microrganismi di interesse alimentare e possibili applicazioni tecnologiche

Ogni anno il 30% della popolazione dei paesi industrializzati è coinvolta in almeno un episodio di tossinfezione alimentare e almeno due milioni di persone muoiono di malattie diarroiche nel mondo. Occorrono perciò nuovi metodi per ridurre o eliminare i patogeni alimentari, da applicare possibilmente in combinazione con metodi già esistenti (*hurdle principle*). Inoltre allo stesso tempo, nei paesi moderni, coesistono contemporaneamente sia il *trend* verso prodotti alimentari ottenuti con *mild technologies*, sia il richiamo dell'OMS alla riduzione del sale per la prevenzione delle malattie cardiovascolari. Una possibilità di combinare queste esigenze può essere rappresentata dagli oli essenziali (EO) come additivi antibatterici. L'attività antimicrobica di molte piante aromatiche e dei loro estratti sono note fin dall'antichità, tuttavia, il loro studio sistematico è stato affrontato solo da poco. Molte delle piante con proprietà antimicrobica trovano applicazione in campo alimentare-come alternativi o sinergisti di additivi antimicrobici convenzionali per il controllo della crescita e della sopravvivenza sia di microrganismi responsabili del deterioramento degli alimenti che di alcuni patogeni alimentari. Si intende valutare: l'attività antimicrobica di alcuni oli essenziali di composizione chimica definita; il sinergismo e l'antagonismo tra i componenti degli EO e i costituenti dell'alimento e la stabilità degli EO alle diverse tecnologie.

Risultati attesi nel triennio

Sarà studiata l'efficacia di alcuni oli essenziali e di alcuni loro componenti rispetto ad alcuni patogeni alimentari e ne saranno valutate le rispettive concentrazioni minime inibenti (MIC). Sarà valutato anche l'effetto matrice relativamente al latte.

Trasferibilità dei risultati

Sarà valutata l'applicabilità di tali EO al settore di lavorazione dei prodotti a base di latte, soprattutto riguardo i prodotti non tradizionali e ai prodotti ottenuti da latte non pastorizzato.

Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali (MICOCER)

La cerealicoltura italiana deve rispondere alle crescenti esigenze di qualità sanitaria e commerciale relativamente alla presenza di micotossine. Attualmente non è disponibile un quadro della contaminazione ottenuto su basi statistiche. Il progetto proposto riguarda frumento

duro e tenero, mais e orzo e esamina variabili culturali e ambientali del territorio nazionale. Azioni del progetto: sviluppo e validazione di nuove metodologie diagnostiche per migliorare l'efficacia del controllo, studio di protocolli di campionamento per le diverse situazioni produttive, sviluppo di linee guida di buona pratica agricola, effettuazione della formazione dei vari soggetti coinvolti, indagine sulle caratteristiche di contaminazione di partite commerciali, monitoraggio della produzione di cereali per le micotossine indicate, creazione di una banca dati sulla contaminazione nei quattro cereali, definizione di percorsi produttivi funzionali alla destinazione d'uso, valutazione dell'effetto dei sistemi di difesa sul contenuto di micotossine, controllo e abbattimento di micotossine attraverso buone pratiche di condizionamento-stoccaggio e nuove pratiche di "preraffinazione", gestione delle tossine negli allevamenti per le diverse produzioni zootecniche di mais, validazione di strumenti per la prevenzione e la gestione della contaminazione, sviluppo di sistemi previsionali per la gestione del rischio da fusariotossine.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità di:

- piani di campionamento mirati
- dati validi sui livelli di contaminazione delle principali micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali
- disciplinari di produzione e di analisi dei rischi per lo specifico aspetto del controllo delle micotossine
- valori soglia per le filiere zootecniche per le principali micotossine per i diversi tipi di animali, allevamenti e diete
- sistema di supporto alle decisioni (DSS) semplice, in forma cartacea o informatica, utilizzabile sia in fase di coltivazione che in post-raccolta
- Individuazione di:
 - siti e condizioni culturali sensibili da utilizzare per un monitoraggio attendibile del grado di contaminazione delle produzioni nazionali
 - varietà dotate di tolleranza agli agenti della fusariosi della spiga

Definizione di un quadro circa la diffusione e il livello di contaminazione delle micotossine non ancora normate a livello comunitario

Valutazione dell'influenza dell'ambiente, della cultivar e dell'agrotecnica sul grado di contaminazione

Quantificazione di:

- livello di salubrità delle produzioni nazionali di mais, frumento duro e tenero in funzione della destinazione d'uso
- effetto dei fattori agronomici sul contenuto di micotossine nei cereali.

Validazione di:

- metodo ELISA, rapido e poco costoso da impiegare per l'analisi di Fumonisina in alternativa al metodo HPLC
- metodo ELISA o di altri test semplici, rapidi e poco costosi da impiegare per l'analisi di DON in alternativa al metodo HPLC

Trasferibilità dei risultati

Divulgazione dei risultati ottenuti a tutti gli operatori del settore (enti e organizzazioni di assistenza tecnica, pubblici e privati, organizzazione dei produttori, cooperative di produzione e stoccaggio, strutture private o cooperative di trasformazione, industrie dei mezzi tecnici (sementiera, agrochimica, meccanica/attrezzature, ecc.). Messa a disposizione delle istituzioni preposte alla attività di controllo e gestione del rischio a livello locale e nazionale di dati

attendibili circa il grado di contaminazione da micotossine delle principali produzioni cerealicole.

I risultati globali del progetto potranno interessare le istituzioni pubbliche nazionali e regionali specificamente preposte alla definizione delle politiche nazionali e comunitarie del comparto cerealicolo e della salute.

**Centro Nazionale
per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentare**

Attività di controllo, valutazione, parere

Diagnosi e caratterizzazione di ceppi microbiocci isolati o da isolare

Al CNQARA (già Laboratorio Alimenti) pervengono richieste da parte di laboratori del controllo ufficiale o da altre istituzioni del 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.

Le indagini riguardano la *L. monocytogenes* da isolati clinici o da alimenti, i vibrieni patogeni generalmente isolati da prodotti della pesca, i clostridi neurotossigeni da campioni clinici o da alimenti, il *Bacillus cereus* da alimenti, i virus enterici da alimenti, la *Yersinia enterocolitica*. L'attività di laboratorio prevede la caratterizzazione mediante metodi tradizionali e di genetica molecolare e la valutazione della patogenicità. 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

Nel 2005 sono stati pervenuti al Centro per tale attività 70 ceppi di *Listeria spp*, 50 virus enterici, 20 vibrieni, 30 campioni per conferma botulismo; sulla base di ciò è prevedibile che nel prossimo triennio potranno essere inviati al Centro un totale di 250 ceppi/campioni.

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. Tali analisi che si basano sull'uso della PCR comportano particolare competenza, acquisto di materiali e personale dedicato e in particolare per l'HAV necessita l'effettuazione della conferma del virus infettante mediante utilizzo di colture cellulari che prevede tempi di analisi piuttosto lunghi (15-20 giorni)

Piano triennale

Per il triennio sono previste almeno 150 analisi

Interrogazioni parlamentari

Il Ministro della Salute è chiamato spesso a rispondere in sede parlamentare a quesiti su problemi di sanità pubblica correlati alla sicurezza alimentare.

Il CNQARA 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 (10 giorni) e la complessità della risposta, necessitano di un notevole impegno da parte di più ricercatori.

Piano triennale

Non è possibile fare una reale programmazione triennale poiché tale attività dipende da situazioni contingenti; alla luce dell'attuale esperienza, si può stimare una media di 15 pareri l'anno, per un totale complessivo di circa 40-45 nel triennio.

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 Decreto Legislativo 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 Istituti Zooprofilattici Sperimentali che svolgono controllo dei prodotti alimentari destinati all'esportazione verso gli USA (su incarico Ministero della Salute);
ispezione, e reispezione quinquennale, degli stabilimenti che producono alimenti dietetici e integratori alimentari ai sensi del DL 111/92 (su incarico del Ministero della Salute)

Piano triennale

Nel 2005 sono state effettuate 80 ispezioni relative alle problematiche sopra indicate; è ragionevole pertanto prevedere che per il triennio dovranno essere effettuate almeno 250 visite ispettive, tenuto conto della possibilità di eventi emergenti che richiedono il sopralluogo a impianti di produzione o a strutture adibite alla somministrazione.

Manuali di Buona Prassi Igienica

L'obbligo previsto dalla normativa vigente di elaborare piani di autocontrollo consente alle imprese di potersi avvalere dei cosiddetti Manuali di Buona Prassi Igienica preparati dalle associazioni di categoria e sottoposti alla validazione del Ministero della Salute. Per quel che concerne gli aspetti tecnico-scientifici il Ministero della Salute si avvale della collaborazione dell'ISS e in particolare del Laboratorio Alimenti, prima, e del CNQARA dopo. Un gruppo di lavoro specificatamente costituito per tale scopo ha provveduto alla valutazione di tali Manuali che nell'ultimo quinquennio sono stati circa 100.

Piano triennale

Nel prossimo triennio verranno esaminate nuove edizioni, aggiornamenti e modifiche di Manuali già validati, per un numero prevedibile tra i 10 e i 20/anno.

Organizzazione di circuiti interlaboratorio per la validazione di metodi di analisi

In qualità di Laboratorio Nazionale di Riferimento per: 1) Analisi e prove sul latte e prodotti a base di latte; 2) Controllo della contaminazione microbiologica e virale dei molluschi bivalvi; 3) Residui limitatamente a "Micotossine" e "Metalli in traccia", il CNQARA deve organizzare circuiti interlaboratorio mirati alla valutazione delle *performance* tecniche dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale che effettuano il controllo ufficiale dei prodotti alimentari. 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. Per l'anno 2005 sono stati organizzati 10 circuiti.

Piano triennale

Per il triennio, data l'esigenza di ampliare il numero di parametri da utilizzare nella valutazione dell'affidabilità dei laboratori del Servizio Sanitario Nazionale, si prevede di dover effettuare prove per almeno 45 *trial*.

Pareri

In qualità di organo tecnico del 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 e efficacia di nutrienti funzionali ad attività antiossidanti, di estratti vegetali e sull'ingannevolezza dei messaggi pubblicitari.

Nel 2005 sono stati espletati 40 pareri.

Piano triennale

Il carico di lavoro che deriva da questa attività dipende dal susseguirsi delle emergenze alimentari che si verificheranno nel corso degli anni; per il prossimo triennio si può ipotizzare un numero di pareri di 50/anno.

Partecipazione a circuiti d'analisi interlaboratorio

In qualità di Laboratorio Nazionale di Riferimento per: 1) Analisi e prove sul latte e prodotti a base di latte; 2) Controllo della contaminazione microbiologica e virale dei molluschi bivalvi; 3) Botulino; 4) Residui limitatamente a "Micotossine", "Antibiotici e sulfamidici", "Metalli in traccia", il CNQARA deve partecipare ai circuiti interlaboratorio organizzati dai rispettivi Laboratori Comunitari di Riferimento (CRL) e altri Istituti internazionali ai fini della valutazione di nuovi metodi di riferimento comunitari e della *performance* del laboratorio. Per l'anno 2005 sono state effettuati 15 circuiti.

Inoltre, in relazione all'accreditamento e sistema di qualità, il Centro deve effettuare obbligatoriamente *Proficiency Testing* sia per le prove accreditate che per le prove in corso di accreditamento. Per l'anno 2005 sono state effettuate 30 prove.

Partecipazione a circuiti interlaboratorio organizzati dal Centro Comune di Ricerca Europeo (Ispra) su richiesta della Commissione UE su acrilammide, furani, idrocarburi policiclici aromatici; per l'anno 2005 ne sono stati effettuati 2.

Piano triennale

Per il prossimo triennio si prevede l'effettuazione di 50 circuiti interlaboratorio/anno.

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 OMS/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, il Ministero della Salute e quello delle Politiche Agricole, hanno demandato all'ISS il compito di rappresentare l'Italia in questi consessi internazionali.

Il presidente dell'ISS ha designato esperti di questo Centro 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): *Advisory Forum*

Unione Europea - European Network of GMO Laboratories (ENGL)

Nel 2005 gli esperti hanno partecipato a 50 riunioni.

Le problematiche della sicurezza alimentare sono state oggetto di valutazione anche da parte di gruppi di lavoro e Commissioni operanti presso il Ministero della Salute e il Ministero delle Politiche Agricole; nel 2005 gli esperti hanno partecipato a 100 riunioni.

Piano triennale

Per il triennio si prevede la partecipazione a 150 riunioni internazionali e a 250 riunioni nazionali.

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 di alimenti 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 microbiologiche. È evidente la necessità che questo riconoscimento venga esteso anche ad altre prove analitiche.

I campi di attività per i quali vengono svolte le revisioni di analisi sono per lo più gli stessi che interessano l'attività di ricerca, in ogni caso nel 2005 sono state effettuate 380 revisioni di analisi.

Piano triennale

Considerando il susseguirsi delle emergenze alimentari verificatesi in questi ultimi anni, è piuttosto difficile poter prevedere il carico di lavoro che può derivare da questa attività; valutando l'andamento delle revisioni di analisi degli ultimi dieci anni si può ipotizzare un numero di revisioni compreso tra 1000 e 1600.

Ripetizioni di analisi

Il Centro esegue ripetizioni di analisi su campioni alimentari di provenienza estera su richiesta degli organi periferici del Ministero della Salute preposti alla vigilanza (PIF, UVAC, USMA).

Piano triennale

Nel prossimo triennio è previsto il proseguimento di queste attività con una media di 40-50 campioni/anno.

Sistema di Assicurazione della Qualità

Dal 2002 il CNQARA ha messo in atto un proprio sistema di assicurazione della qualità, in accordo a quanto stabilito dalla norma ISO 17025/2000.

Piano triennale

Per il mantenimento e il miglioramento di questo sistema si prevedono interventi di manutenzione e taratura di tutte le apparecchiature utilizzate per lo svolgimento dell'attività istituzionale da parte di ditte esterne certificate.

Sorveglianza integratori alimentari e alimenti arricchiti

In base a quanto stabilito da un recente Decreto Legislativo (21 maggio 2004 n. 169 art. 13) il CNQARA 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.

Per quanto riguarda i probiotici nel 2005 sono stati controllati 90 campioni.

Piano triennale

Per tale attività si ipotizza per il prossimo triennio la sorveglianza su circa 250 integratori alimentari/anno e 100 alimenti arricchiti/anno.

Validazione Metodi di analisi e definizione criteri di qualità

Nell'ambito dell'attività dei Laboratori Nazionali di Riferimento:

Residui, si rende necessaria la validazione di 4-5 metodi/anno per la determinazione dei residui di farmaci ad azione antibatterica e elementi in traccia tossici in alimenti di origine animale da trasmettere agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali

Latte, si rende necessaria la validazione di 3-4 metodi/anno per la determinazione dei residui di inibenti nei prodotti di origine animale e 3-4- metodi/anno per i parametri microbiologici del latte

Micotossine, si rende necessaria la validazione di 7-8 metodi/anno per la fissazione di limiti massimi specifici

Piano triennale

Questa attività già svolta negli anni passati sarà molto impegnativa per il futuro a causa del crescente interesse nazionale e comunitario per tali argomenti; si può ipotizzare, per il prossimo triennio, la validazione di 40-50 metodi.

Centro Nazionale Trapianti

Attività di ricerca

1. Protocolli clinici per la sorveglianza dei trapianti a rischio calcolato

Proseguirà il monitoraggio dei pazienti trapianti con organi definiti a rischio aumentato ma accettabile e a rischio calcolato. L'attuale disponibilità di farmaci ad attività antivirale nei confronti delle infezioni virali (HBV, HCV, ecc.), unitamente ai buoni risultati ottenuti con i protocolli di profilassi sul ricevente, fanno ritenere che il rischio connesso all'utilizzo di tali organi possa essere considerato accettabile se si attuano opportune misure di sorveglianza e profilassi. Attraverso l'assidua sorveglianza di questi trapianti, il programma si propone di documentare la fattibilità di tali interventi. Il monitoraggio dovrà proseguire per almeno 5 anni al termine dei quali si analizzeranno i risultati

2. Protocollo di studio comparativo per la valutazione dei trattamenti artificiali sostitutivi nelle insufficienze epatiche

Le varie metodiche adottate da diversi centri di trapianto nel trattamento sostitutivo delle insufficienze epatiche non permettono oggi di avere un riscontro comparabile e oggettivo dei risultati raggiunti nelle varie esperienze. Il CNT nel 2005 ha aperto un *forum* sull'argomento coinvolgendo tutte le strutture interessate. Lo scopo del *forum* dal quale discenderà un protocollo operativo, sarà quello di uniformare la raccolta dei dati di ciascun centro individuando gli *end-point* di ogni sperimentazione al fine di indicare quale delle metodiche in uso dà maggiori garanzie di supporto della funzionalità epatica intesa come risoluzione del quadro patologico o stabilizzazione della condizione iniziale precaria in attesa del trapianto. Il programma necessiterà di un monitoraggio continuo delle attività e dei risultati.

3. Progetto di Qualità del Processo di Identificazione dei Donatori di Organi (progetto QPIDO)

Il progetto ha quali scopi e obiettivi quelli di: descrivere le caratteristiche funzionali dei servizi di rianimazione del territorio e le modalità operative per l'erogazione delle prestazioni; pianificare localmente il percorso e le strategie con cui monitorizzare i soggetti con gravi lesioni encefaliche sottoposti a misure rianimatorie; predisporre protocolli operativi per il corretto svolgimento del processo di donazione; descrivere le fasi cliniche e assistenziali attraverso cui viene trattato il potenziale donatore; definire il processo di verifica e validazione del programma locale di "*Local procurement*"

4. Applicazione Clinica del test diagnostico di "paternità dei Tumori"

Il progetto che rientra nei programmi di sicurezza del trapianto ha quale scopo quello di raccogliere i dati significativi che comprovino l'efficacia diagnostica del *test* e ne rilevino l'importanza a fini terapeutici. Il *test*, disponibile presso il laboratorio di patologia Molecolare e dei trapianti del Policlinico S. Orsola Malpighi di Bologna, attraverso l'utilizzo di metodiche di medicina molecolare permette con assoluta sensibilità e specificità di stabilire la "paternità" dei tessuti dai quali origina una neoplasia insorta in un ricevente di organi solidi

5. Progetto "Fattori prognostici di sopravvivenza nelle pneumopatie croniche avanzate dopo il trapianto di polmone: l'utilità di un registro nazionale"

Il progetto ha quale scopi quelli: di raccogliere dati per poter dare vita a un registro italiano dei trapianti di polmone; di raccogliere le informazioni cliniche dei centri di trapianto nazionale; di elaborare i dati e individuare i fattori prognostici sull'*outcome*.

6. Progetto: 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 delle fase operativa del trapianto di fegato; l'elaborazione dei dati e l'individuazione di fattori prognostici dell'*outcome* a breve termine (primari *non fuction* e *delayed non fuction*) e a lungo termine, attraverso il *follow up* prospettico per complessivi 5 anni di coorte costituita da 1000 trapianti consecutivi eseguiti dai vari centri italiani e l'eventuale valutazione retrospettive dei dati in possesso del CNT.

7. Ottimizzazione del *database* e verifica dati dei riceventi di organi provenienti da donatori a rischio calcolato neoplastico

L'utilizzo di donatori con patologia infettiva o tumorale è un evento raro nella pratica dei trapianti in Italia, anche se esistono molte situazioni in cui il bilancio rischio-beneficio impone delle scelte a rischio calcolato. Si tratta di scelte, accettate dalla comunità medica, che prevedono l'utilizzo di donatori con particolari condizioni di rischio. Obiettivo del progetto è dunque quello di collegare il *database* informatico dei donatori a rischio con quello dei riceventi, con lo scopo di identificare i soggetti riceventi di organi a rischio neoplastico, e quindi di analizzare i dati ricevuti per valutare l'incidenza e la mortalità per tumore. A completamento ci si propone inoltre di eseguire il *follow up* attivo strutturato con l'accordo degli Enti preposti al coordinamento dell'attività di trapianto al fine di raccogliere informazioni sul tipo di tumore eventualmente sviluppatosi in tali riceventi

8. Progetto *HIV Organ Sharing and Trasplantation HOST*

Dal 2001 è in atto presso le U.O. di Malattie Infettive dell'azienda ospedaliera di Bologna una ricerca epidemiologica a carattere nazionale definito progetto *HIV Organ Sharing and Trasplantation*, c.d. HOST. Gli obiettivi del progetto sono : effettuare e mantenere attiva una raccolta di dati provenienti da soggetti con infezione da HIV e patologia terminale d'organo; elaborare periodicamente stime sull'esigibilità alla lista d'attesa e quindi sulla eventuale richiesta d'organi donati per questa tipologia di soggetti; inviare ai centri che segnalano i casi una selezione preliminare che orienta l'eventuale studio per l'inserimento in lista presso i centri trapianto individuati per il trapianto nei soggetti con infezione da HIV. Il progetto rappresenta una base di partenza per lo sviluppo di un progetto di raccolta dati su più ampia scala che si ritiene possa accordarsi con gli obiettivi del Centro nazionale Trapianti

Centro Nazionale Trapianti

Attività di controllo, valutazione, parere

1. Sorveglianza dei centri di trapianto abilitati alla sperimentazione dei trapianti in soggetti con infezione da HIV

Piano triennale

Il monitoraggio di tale sperimentazione discende dai protocolli nazionali e risponde a una precisa indicazione dello *Steering Committee*. Allo scopo è stata costituita un'apposita commissione di esperti che dovrà continuare a verificare, in ogni centro abilitato, il mantenimento dei requisiti previsti dal protocollo in base ai quali è stata concessa l'autorizzazione al trapianto in soggetti con infezione da HIV. Il monitoraggio riguarderà: la gestione del paziente in lista di attesa con particolare riguardo al rispetto dei criteri di inclusione, di esclusione e dei controlli previsti dai protocolli; le condizioni del paziente al momento del trapianto nonché la gestione dello stesso nel *follow-up*.

10. Avvio delle ispezioni ai centri di rianimazione del territorio nazionale

Piano triennale

È stato avviato un sistema di sorveglianza nei centri di rianimazione italiani allo scopo di documentarne l'entità, la tipologia e le patologie trattate. Allo stato attuale è stata effettuata una prima ricognizione demografica. È in programma l'avvio delle ispezioni in ogni rianimazione al fine di documentare i percorsi con cui vengono individuati e trattati i soggetti con gravi lesioni encefaliche sottoposti a misure rianimatorie. L'obiettivo è quello di migliorare l'efficienza di questi centri nella identificazione di tutti i potenziali donatori attraverso l'adozione di protocolli e strategie operative per l'ottimale svolgimento del processo di donazione. Tale iniziativa richiederà almeno due anni e dovrà essere concordata con le Regioni che attraverso i propri centri regionali dovranno collaborare con il CNT alla realizzazione del progetto.

11. Sorveglianza del programma nazionale di trapianto di rene per i pazienti di difficile trapiantabilità

Piano triennale

Il programma è stato avviato nel 2005 con l'obiettivo di favorire l'accesso al trapianto per alcuni pazienti che da oltre 10 anni sono in attesa di trapianto di rene e che hanno una situazione clinica e/o immunologia penalizzante. Per tali pazienti solo la ricerca su vasta area (nazionale) del donatore ideale, può aumentare concretamente le possibilità di trapianto e il buon esito dello stesso. I risultati preliminari sono positivi ma il programma richiede un monitoraggio continuo con valutazione degli esiti a breve e lungo termine.

12. Regolamentazione delle emergenze di cuore in ambito nazionale

Piano triennale

Nel 2005 sono state emanate le procedure per lo scambio di cuori in urgenza (criteri di cessione-restituzione) in ambito nazionale al fine di soddisfare lo status di "emergenza" nazionale per i pazienti ricoverati presso un Centro di Trapianto o una struttura ad esso collegata con indicazioni al trapianto e che sono in trattamento con dispositivi e/o terapie intensive. Il programma necessita di una sorveglianza continua sia in termini di risultati, sia in termini di evoluzione del protocollo stesso.

13. Archivio biologico nazionale per la sicurezza della rete trapiantologica

Piano triennale

Il CNT nel 2005 ha costituito un bioconservatorio dei campioni biologici dei donatori e dei riceventi presso ogni centro regionale e/o interregionale. L'iniziativa si pone l'obiettivo di incrementare i livelli di sicurezza della rete trapiantologica. Il bioconservatorio permetterà, 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

14. Progetto qualità dei trapianti effettuati

Piano triennale

Prosegue la pubblicazione annuale dei risultati nazionali e per singolo centro dei principali programmi di trapianto attivi sul territorio nazionale. A completamento delle statistiche pubblicate negli anni precedenti (trapianti di fegato, di rene, di cuore) nel 2005 saranno analizzati e resi pubblici i risultati dei trapianti di intestino e di midollo.

15. Certificazione nazionale dei coordinatori

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti ha avviato un progetto di certificazione dei singoli operatori che partecipano e controllano il processo di donazione degli organi, quale naturale completamento del progetto di qualità intrapreso. Anche in questo caso verrà istituita un'apposita commissione che, sulla base dell'esperienza maturata in campo europeo, dei livelli di qualità raggiunti in Italia, della normativa vigente e delle raccomandazioni nazionali ed internazionali, definirà i criteri minimi per ottenere la Certificazione, rivedibili anno per anno, e li diffonderà mediante bando annuale adeguatamente divulgato dal Centro Nazionale e dai Centri Regionali

16. Documento sulle procedure regionali per le autorizzazioni dei centri di trapianto di organi

Piano triennale

In previsione del passaggio delle competenze per le autorizzazioni di nuovi centri di trapianto dal Ministero della Salute alle Regioni, il CNT si propone di formulare un documento descrittivo sulle procedure operative che ogni struttura dovrà attuare al fine di avviare l'iter autorizzativo nel rispetto delle Linee Guida per l'idoneità e il funzionamento dei centri individuati dalle regioni come strutture idonee ad effettuare trapianti di organi e di tessuti

17. Progetto donazione e trapianto di cellule staminali emopoietiche: raccolta ed elaborazione epidemiologica dei dati

Piano triennale

Il progetto che vede coinvolta la collaborazione dell'I.B.M.D.R. (*Italian Bone Marrow Donor Registry*) ha quale scopo quello di raccogliere ed elaborare dati e informazioni epidemiologiche importanti per il controllo e la gestione delle donazioni e dei trapianti di cellule staminali ematopoietiche da midollo osseo, sangue periferico e cordone ombelicale. Il controllo e la valutazione avviene tramite l'ausilio e il supporto del sistema informativo trapianti

18. Protocollo sulla gestione del programma di trapianto di intestino e multiviscerale

Piano triennale

È stato implementato un protocollo nazionale per il trapianto di intestino e multiviscerale con l'autorizzazione di tre centri di trapianto sul territorio nazionale. Tale protocollo presuppone una sorveglianza continua del programma in ambito nazionale con la verifica periodica delle procedure di allocazione codificate e condivise da tutta la rete trapiantologia e con la valutazione degli esiti.

19. Progetto sperimentale per la raccolta e l'elaborazione di dati epidemiologici nell'ambito dei programmi di trapianto di fegato in soggetti con infezione da HIV

Piano triennale

Il progetto ha quali scopi quelli di implementare e mantenere un sistema permanente di collaborazione tra unità operative di malattie infettive finalizzato allo studio dei dati epidemiologici, clinici terapeutici dei soggetti con infezione da HIV e patologia terminale d'organo con particolare riferimento a fegato e rene

2. Task force di esperti (*second Opinion*)

Piano triennale

Ad integrazione delle linee guida sulla sicurezza del donatore (accordo conferenza stato regione 26 novembre 2003) è stata nominata, con decreto del Ministro della Salute 27 ottobre 2004 una commissione di medici esperti composta da due coordinatori nazionali, un medico legale, un infettivologo e un anatomopatologo. La *second opinion* garantisce alla rete nazionale trapianti 24 ore su 24 un supporto reale di elevate competenze per la valutazione dei casi clinici di dubbia interpretazione.-

20. sviluppo gestione e manutenzione SIT: registro donazioni, trapianti e liste di attesa

Piano triennale

Attività di sviluppo di nuove implementazioni, gestione delle funzioni attualmente presenti e manutenzione legata ad aggiornamenti tecnologici del Sistema Informativo Trapianti.

21. Implementazione e gestione Registro raccolta dati follow-up Trapianti di Organo

Piano triennale

Modifica della funzione di acquisizione dei dati relativi ai donatori provenienti dall'estero per la raccolta degli stessi dati delle donazioni italiane (incluso livello di rischio).

22. Analisi, progettazione e sviluppo Sistema Informativo Tessuti e Cellule

Piano triennale

Integrazione all'interno del SIT dei dati relativi all'attività di donazione e trapianto di tessuti e cellule. Come da direttive europee il nuovo Sistema Informativo dovrà garantire la tracciabilità dell'intero processo

23. Relazioni organizzative con Ministero della Salute - Direzione SIS per gestione SIT

Piano triennale

Gestione dei rapporti organizzativi con il Ministero della Salute e la Direzione del Sistema Informativo Sanitario, di cui il SIT fa parte integrante, per assistenza tecnica relativa alla gestione della rete SIT

24. Coordinamento e supporto all'attività di inserimento dati di Centri Trapianto e Centri di Riferimento

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti svolge una costante attività di coordinamento e supporto dei Centri Trapianto e i Centri di Riferimento per il monitoraggio della qualità dei dati inseriti nel SIT. Attività di inserimento dati relativi all'attività di donazione e trapianto da cadavere dell'area *Nord Italian Transplant program* fino a alla fine del 2005, data in cui sarà disponibile una procedura SOAP che consentirà il "dialogo" in tempo reale tra i *software* regionali e il SIT

25. Registro "Cerebrolesi"

Piano triennale

Continuazione della raccolta di dati epidemiologici relativi al numero di decessi con lesioni cerebrali in tutte le U.O. di terapia intensiva del territorio nazionale

26. Registro "neoplastici"

Piano triennale

Continuazione della raccolta di dati epidemiologici e clinici relativi ai donatori con patologia neoplastica che dal primo gennaio 2006 verrà effettuata tramite apposita funzionalità implementata nel SIT

27. Gestione Informatica Database Numero Verde

Piano triennale

Supporto tecnico per l'estrazione dei dati presenti nel *database* del Numero Verde Trapianti utilizzati per fini statistici

28. Gestione anagrafica Centri Trapianto

Piano triennale

Raccolta dei dati anagrafici e di riferimenti utili al cittadino (orario di servizio, numeri utili, ecc.) dei Centri Trapianto per la pubblicazione sul sito del Ministero della Salute.

29. Assistenza tecnica e supporto agli utenti SIT - funzioni gestionali

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti svolge una costante attività di supporto agli utenti SIT per il corretto utilizzo di tutte le funzioni a loro disposizione

3. Servizio di pronta disponibilità

Piano triennale

Proseguirà il servizio di reperibilità 24 ore su 24 per tutto l'anno, garantito dai medici (al momento due unità) del Centro Nazionale Trapianti al fine di supportare tutta la rete sul territorio nazionale nei processi decisionali delle attività di prelievo e trapianto con funzione di integrazione al servizio di *second opinion*.

30. Supporto ai centri trapianto per la valutazione degli esiti (*follow-up*)

Piano triennale

Continuazione della raccolta e analisi dei dati sulla sopravvivenza dei pazienti trapiantati e dei *graft* nonché di altri dati sulla qualità di vita dei pazienti trapiantati attraverso apposita funzionalità implementata nel SIT

31. Assistenza tecnica e di supporto all'utilizzo datawarehouse da parte degli utenti SIT

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti svolge una costante attività di supporto all'interrogazione del *datawarehouse* al fine di produrre una reportistica che possa rispondere alle necessità degli utenti SIT

32. gestione e sviluppo *datawarehouse sit*

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti ha sviluppato un sistema di *datawarehouse* per ottimizzare la produzione di reportistica. I dati raccolti nel sistema Gestionale vengono riorganizzati al fine di ottimizzare le procedure di estrazione dei dati e consentire lo sviluppo di *report* complessi. Inoltre, tramite *software* dedicati, le tabelle del *datawarehouse* vengono riorganizzate in "universi" tematici che consentono all'utente una più semplice interrogazione del *database*.

33. Reportistica relativa all'attività di donazione e trapianto

Piano triennale

Il SIT comprende una sezione *on-line* dedicata allo sviluppo di reportistica. Ciò consente al CNT di pubblicare *on-line* una reportistica *standard* per il monitoraggio dell'attività, di predisporre *report* "a richiesta" da parte degli utenti SIT, nonché di consentire agli utenti SIT di sviluppare la propria reportistica. Il Centro Nazionale Trapianti sviluppa costantemente reportistica di supporto decisionale, monitoraggio dell'attività, di supporto agli *audit* dei Centri Trapianto e di Riferimento, di reportistica finalizzata alla preparazione di convegni, riunioni tecniche e conferenze.

34. DPS per sicurezza (*privacy*)

Piano triennale

Legge inerenti al Codice in materia di protezione dei dati personali, ha redatto un proprio Documento Programmatico per la Sicurezza. Il DPS viene costantemente aggiornato per rispondere alle nuove esigenze del Centro

35. Gestione Smart Card SIT

Piano triennale

Gli utenti possono accedere al Sistema Informativo Trapianti solo tramite utilizzo di una propria *Smart Card*. Il Centro Nazionale Trapianti si occupa del rilascio di nuove *smart card* e del loro rinnovo annuale

36. Gestione profili utenti SIT

Piano triennale

L'accesso al SIT tramite *smart card* consente al sistema di identificare l'utente connesso e di prospettargli sia in consultazione, sia in inserimento, solo le funzioni di propria competenza. Ciò avviene tramite una attenta gestione dei diversi profili utente effettuata da parte del Centro Nazionale Trapianti

37. Adeguamento e manutenzione hardware e software per la messa in atto del DPS

Piano triennale

Implementazione Sistema di *back-up* dati sensibili. Registro *Hardware* Sistema di gestione utenze per la mobilità dei dati sensibili: portatili e memorie esterne. Gestione delle problematiche inerenti trasmissione di dati sensibili: *Smart Card* e crittografia

38. Definizione ed implementazione della metodologia della valutazione della "Qualità" del trapianto di midollo

Piano triennale

Attività di valutazione dell'outcome dei trapianti di midollo in collaborazione con il Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo GITMO

4. Ispezioni (*Audit*) presso i centri di trapianto di cuore e di polmone del territorio nazionale

Piano triennale

A completamento del progetto "trasparenza del sistema" saranno avviate le ispezioni (*Audit*) ai centri di trapianto di cuore e di polmone. Anche in queste strutture verranno verificate: le caratteristiche tecniche delle strutture chirurgiche; la gestione delle liste di attesa; l'attività di trapianto da donatore cadavere; i risultati. L'iniziativa va ad integrare l'esperienza iniziata con i centri di trapianto di fegato, di rene e con i centri di coordinamento e fa parte del percorso complessivo di qualità che ha intrapreso tutto il sistema. Le ispezioni inizieranno nel 2006 e termineranno nel 2007.

5. Banche dei tessuti

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti con la collaborazione delle Banche dei Tessuti ha definito nel corso del 2004 le linee guida per prelievo, processazione, conservazione e distribuzione del tessuto muscolo scheletrico, delle cornee, della cute, dei vasi e delle valvole a scopo di trapianto. Per adeguarsi alla Direttiva del Parlamento Europeo 2004/23, è stato inoltre pianificato un sistema di accreditamento e di ispezioni di tutte le strutture che raccolgono,

processano, conservano e distribuiscono i tessuti. Il programma di ispezioni ha avuto inizio nel marzo 2004, dopo la costituzione di un gruppo di ispettori comprendente anche esperti di Banche dei Tessuti. Gli ispettori sono stati formati attraverso un corso con una sessione teorica e una simulazione pratica organizzato dal CNT.

6. Ispezioni (*audit*) ai centri di coordinamento in Italia

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti si propone di continuare la sorveglianza sulle attività dei centri di coordinamento a completamento delle ispezioni (*audit*) avviate nel mese di luglio 2005 relative a tutti i centri regionali e interregionali attivi sul territorio nazionale. L'iniziativa, che rientra nel percorso di qualità e trasparenza di tutte le unità operative del sistema trapianti italiano, si basa essenzialmente sulla periodica verifica del raggiungimento-mantenimento di specifici *standard* di efficienza ed efficacia pre-determinati e evidenziati con gli *audit*. Tale monitoraggio dovrà essere eseguito almeno con cadenza biennale e condiviso con ogni Regione che ne dovrà verificare e certificare la sussistenza. Rappresenta un aspetto importante nel processo di miglioramento continuo della qualità al fine di documentare che i centri di coordinamento, nello svolgimento delle proprie funzioni, sono in grado di assicurare un servizio conforme agli obiettivi prefissati e alle norme in vigore.

7. valutazione rischio tessuti

Piano triennale

Il Centro Nazionale Trapianti continuerà sviluppare programmi concernenti l'adeguamento delle strutture italiane agli *standard* indicati dalla Direttiva Europea 2004/23 e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità

8. Controlli di qualità nei laboratori di immunogenetica

Piano triennale

Proseguono i controlli ai laboratori di immunogenetica della rete trapiantologia italiana. Tali controlli vengono svolti dal servizio di immunologia dell'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il Centro Nazionale Trapianti con cadenza annuale. Al controllo partecipano tutti i centri accreditati che con cadenze stabilite (trimestrali) inviano campioni di siero su cui il laboratorio dell'Istituto Superiore di Sanità effettua le verifiche di qualità e di risultato comunicando il responso. Annualmente viene redatta una relazione ufficiale sulle verifiche effettuate

9. controllo protocolli operativi nazionali di allocazione degli organi (urgenze trapianti pediatrici, trapianti fegato-split, trapianti da donatore vivente)

Piano triennale

Prosegue la periodica attività di verifica dei protocolli operativi di allocazione basata su analisi di risultato e di tipo organizzativo effettuate da apposite commissioni coordinate dal Centro Nazionale Trapianti

**Servizio biologico
e per la gestione della sperimentazione animale**

Attività di ricerca

Studio della Superossido Dismutasi periplasmatica di *Vibrio cholerae* e del suo ruolo nel meccanismo di difesa dall'ospite

Il colera è una malattia infettiva provocata da *Vibrio cholerae*, un batterio in grado di colonizzare gli epiteli intestinali e di secernere una potente esotossina. Non esiste un vaccino in grado di garantire una copertura efficace e di lunga durata che contrasti la malattia. È stata evidenziata la presenza, in diversi batteri Gram-negativi, di un gene *sodC* che codifica per l'enzima periplasmatico Cu,Zn superossido dismutasi (Cu,ZnSOD). Quest'enzima svolge un ruolo fondamentale nella difesa dell'ospite dall'attacco di neutrofili e macrofagi e ha un'importanza significativa nel proteggere i microrganismi dal superossido di provenienza extracellulare. Studi preliminari condotti presso il Settore Biologico dell'ISS hanno permesso di isolare il gene *sodC* di *V.cholerae* attraverso tecniche di PCR e di clonarlo in *E.coli* (1). L'ottimizzazione del sistema di espressione e l'uso di diverse tecniche cromatografiche hanno permesso il recupero di quantità apprezzabili di proteina ricombinante e la sua caratterizzazione biochimica (1). Tale studio è stato condotto contemporaneamente su diverse Cu,ZnSOD periplasmatiche (*E.coli*, *P.leiognathi*, *S.Typhimurium*) e in comparazione con la Cu,ZnSOD citoplasmatica bovina per dimostrare l'ipotesi che le proteine eucariotiche, a differenza di quelle procariotiche, rispondono in modo molto diverso al trattamento con particolari agenti chimici (ETA, proteinasi K, HCO₃⁻) e che tali proprietà sono la testimonianza delle differenze che esistono nella struttura quaternaria e nel sito attivo delle due classi di proteine (2). I risultati finora ottenuti sembrano suggerire il coinvolgimento della Cu,ZnSOD periplasmatica di *V.cholerae* nel processo di infezione nei confronti dell'ospite. Per verificare l'eventuale esistenza di una correlazione tra virulenza e attività SOD si sta tentando di costruire un mutante *knockout* per il gene *sodC*.

Risultati attesi nel triennio

Anno 2006:

Verranno tentate nuove strategie per produrre il mutante *knockout* per il gene *sodC* di *V. cholerae*. Attualmente sono disponibili in letteratura dei nuovi metodi utilizzati in ceppi diversi di Salmonella e si potrebbe tentare di estendere, con eventuali variazioni, la metodologia anche per il di *V.cholerae*

Anni 2007-2008

Una volta ottenuto il mutante *sodC* – sarà possibile analizzare il suo comportamento verso lo stress ossidativo e utilizzarlo in studi di infezione su modelli cellulari in confronto con il ceppo parentale. In particolare si intende utilizzare una linea cellulare umana intestinale per mimare in vitro l'interazione tra le cellule del *V. cholerae* e il loro bersaglio naturale e una linea macrofagica umana per verificare la funzione della Cu,ZnSOD nella difesa delle cellule batteriche dal "burst respiratorio". Questi studi potrebbero consentire l'acquisizione di nuove conoscenze utili a chiarire le basi molecolari del processo d'infezione e per ottenere i dati indispensabili per il miglioramento e lo sviluppo di strategie terapeutiche.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi potrebbero consentire l'acquisizione di nuove conoscenze utili a chiarire le basi molecolari del processo d'infezione e per ottenere i dati indispensabili per il miglioramento e lo sviluppo di strategie terapeutiche.

Studio funzionale dei geni per la Superossido dismutasi periplasmatica del ceppo enteroemorragico *Escherichia coli* O157:H7 e del loro ruolo nel meccanismo di difesa dell'ospite

Il ceppo O157:H7 è solo uno dei molti sottotipi di *E.coli*. Sebbene la maggior parte di questi microrganismi sia innocua e normalmente residente nell'intestino di uomini e animali sani circa 75.000 casi di infezione sono stati stimati nel 2005 solo negli Stati Uniti, di questi 61 con esito mortale. L'infezione causa generalmente una colite emorragica e, successivamente, nel 7-10% dei casi (nei bambini in età inferiore ai 5 anni e negli anziani), si instaura la sindrome emolitica uremica, una malattia che presenta complicanze renali e distruzione degli eritrociti, che richiede trattamenti intensivi come dialisi e trasfusioni di sangue e che, nel 5% dei casi, ha esito fatale (1). Nonostante siano stati effettuati molti studi per comprendere i meccanismi con cui *E. coli* O157:H7 colonizza le cellule dell'epitelio intestinale, non sono state ancora chiarite le modalità di difesa utilizzate dal batterio per proteggersi dall'ospite. È stato recentemente dimostrato che molte specie batteriche riescono a prevenire il danno ossidativo, sopravvivendo all'azione battericida delle cellule ospiti, grazie all'enzima superossido dismutasi (SOD) (7,8). Obiettivo del nostro progetto è quello di valutare se e quali dei geni *sodC* possano modulare la virulenza di *E.coli* O157:H7.

Risultati attesi nel triennio

Anno 2006:

Il ceppo O157:H7 di *Escherichia coli* possiede 3 copie del gene *sodC*, una omologa al gene che normalmente si trova in tutti i batteri patogeni, e due di origine fagica. Si intende innanzitutto produrre i singoli *knockout* per tali geni e la combinazione dei tre per un totale di 5 mutazioni.

Anni 2007-2008:

Una volta ottenuti i diversi mutanti *sodC* ⁻ C verranno effettuati studi di infezione su modelli cellulari per individuare la funzione delle varie copie del gene e il loro ruolo nel processo di difesa dall'ospite. In particolare si intende utilizzare una linea cellulare umana intestinale per mimare *in vitro* l'interazione tra le cellule del ceppo O157: H7 e il loro bersaglio naturale e una linea macrofagica umana per verificare la funzione della Cu,ZnSOD nella difesa delle cellule batteriche dal "burst respiratorio".

Trasferibilità dei risultati

Tale studio potrebbe 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.

La Trascrittasi Inversa endogena nel rimodellamento della cromatina di cellule normali e trasformate e in embrioni precoci

I processi di trasformazione cellulare e dell'embriogenesi precoce condividono alcune caratteristiche biochimiche e molecolari. In alcuni casi, le cellule trasformate riattivano l'espressione di fattori attivi nel corso dello sviluppo. In questo progetto ci proponiamo di verificare l'ipotesi, emersa dal nostro precedente lavoro e anche da evidenze provenienti da altri laboratori, che la Trascrittasi Inversa (RT) endogena controlli il differenziamento cellulare e lo sviluppo modulando l'espressione genica attraverso un meccanismo epigenetico. L'inibizione dell'RT riduce infatti la proliferazione delle cellule tumorali e ne induce il differenziamento. Per chiarire questo meccanismo studiamo il ruolo della Trascrittasi Inversa (RT) endogena nell'organizzazione della cromatina nucleare e nella sua funzione sia nelle cellule tumorali che negli embrioni precoci.

Risultati attesi nel triennio

Analisi ad alta risoluzione della localizzazione e funzione nucleare di geni sensibili all'inibizione di RT in cellule tumorali e normali e in embrioni precoci.

Caratterizzazione del meccanismo di controllo genico RT-dipendente attraverso il quale l'organizzazione della cromatina nucleare viene modellata.

Valutare se l'RT endogena può essere utilizzata come nuovo potenziale *target* nella terapia anti tumorale.

Trasferibilità dei risultati

Definire protocolli finalizzati al silenziamento o alla riduzione dell'espressione di geni coinvolti nel processo di trasformazione che siano sensibili al controllo esercitato da RT. La modulazione di RT può essere ottenuta per via farmacologica (efavirenz, nevirapina) o molecolare per RNA interference (RNAi). Questo studio favorirebbe una terapia differenziativa dei tumori contrapposta a quella citotossica.

Ruolo della Trascrittasi Inversa endogena nella crescita tumorale e nel differenziamento embrionale

Il possibile ruolo della Trascrittasi Inversa (RT) endogena in processi biologici fondamentali è da qualche anno l'obiettivo principale dell'attività di ricerca del nostro gruppo. Nel corso di questi studi, abbiamo trovato un'attività endogena RT funzionante sia negli embrioni pre-impianto che in linee cellulari progenitrici o trasformate, il cui blocco, ottenuto con inibitori farmacologici dell'RT nevirapina e efavirenz o per RNA *interference* (RNAi) causa: a) un drastico arresto dello sviluppo embrionale, b) una riduzione della proliferazione cellulare in numerose linee cellulari murine e umane accompagnata da un processo differenziativo, c) una riprogrammazione dell'espressione di geni coinvolti nel controllo della proliferazione (ciclina D1, p16). Inoltre, anche blasti primari umani della leucemia mieloide acuta (AML) vengono indotti a differenziare in risposta al trattamento con nevirapina.

Questi risultati suggeriscono che l'attività RT è associata alla rapida proliferazione cellulare e al blocco differenziativo e inoltre che gli inibitori dell'RT possono essere impiegati per modulare la crescita cellulare e nella terapia clinica dei tumori.

Nell'ambito di questo programma ci proponiamo di: a) studiare l'efficacia anti-tumorale di inibitori RT su topi nudi inoculati con tumori umani; b) ottenere il *knock-out* funzionale della famiglia multigenica codificante RT per RNA interference (RNAi); c) caratterizzare il meccanismo d'azione dell'RT endogena nel processo differenziativo e nella crescita tumorale.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppare e approfondire gli studi intrapresi negli ultimi due anni sull'inibizione della progressione tumorale esercitata dall'inibitore di RT efavirenz. In particolare ci si propone di caratterizzare istologicamente e per immunostochimica i tumori umani la cui crescita sia stata bloccata nei topi nudi. Ci proponiamo inoltre di sviluppare un protocollo di terapia genica utilizzando un adeguato vettore virale capace di esprimere in kodo costitutivo nelle cellule tumorali i piccoli RNA interferenti. Inoltre è in corso un'analisi per *microarray* allo scopo di individuare i geni la cui alterata espressione è coinvolta nel controllo della tumorigenesi da parte di RT.

La caratterizzazione del ruolo dell'RT endogena, e degli effetti della sua inibizione, sono stati studiati fino ad ora in parallelo in cellule tumorali e in embrioni murini precoci. Lo studio comparativo dei due sistemi è estremamente vantaggioso perché consente di definire a) il ruolo centrale dell'RT sia nel differenziamento normale (embriogenesi) che patologico (tumorigenesi) e b) le analogie molecolari dei due processi, indizi di una comune origine. Pertanto, la sperimentazione sugli embrioni procederà in modo simile a quello sulle cellule tumorali anche se finalizzata essenzialmente a conoscenze di base.

Trasferibilità dei risultati

La ricaduta pratica che ci si aspetta da questi studi è lo sviluppo di una terapia anti-cancro basata sull'inibizione farmacologica dell'RT endogena o sull'interferenza dell'espressione dei retroelementi che codificano per l'RT.

Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci antiretrovirali inibitori della proteasi HIV e inibitori non nucleosidici della Trascrittasi Inversa, da soli o combinati: studi preclinici *in vitro* e *in vivo*

Nel corso degli ultimi anni abbiamo dimostrato che l'inibizione della Trascrittasi Inversa (RT) endogena per via farmacologica, usando inibitori non nucleosidici (NNRT, efavirenz, nevirapina), o per inibizione dell'espressione dei retroelementi che codificano RT mediante RNA *interference* (RNAi), provoca una riduzione della proliferazione cellulare e promuove il loro differenziamento. Il laboratorio della Dott.ssa Ensoli ha inoltre dimostrato che l'inibitore della proteasi da HIV (HIV-PI) ha un'azione antitumorale mediata da un effetto anti angiogenico. Scopo del presente progetto è di valutare se l'uso combinato delle due classi di farmaci, NNRT e PI, abbiano un potenziato effetto anti tumorale rispetto alla loro somministrazione individuale. Il presente studio è svolto *in vitro*, su colture cellulari tumorali umane, e *in vivo* su modelli murini.

Risultati attesi nel triennio

Chiarire il meccanismo di azione degli NNRT e caratterizzare il i) substrato i) RT bersaglio
Definire il ruolo dell'RT endogena nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare e nella genesi e progressione tumorale.

Identificare e meglio chiarire i meccanismi di azione antitumorali degli HIV-PI e degli NNRTI e valutare se hanno un effetto sinergico sia in studi *in vivo* che *in vitro*.

Trasferibilità dei risultati

Ricaduta pratica di questo progetto di ricerca è lo sviluppo di un protocollo terapeutico anti-cancro potenziato. Il protocollo è basato sull'inibizione simultanea dell'RT e PI endogeni.

Tecnologie riproduttive: transgenesi e sviluppo di metodi innovativi per la transgenesi e la terapia genica embrionale

Gli obiettivi che questo lavoro si propone sono tre: 1) Caratterizzazione del meccanismo di base che regola l'associazione e l'internalizzazione delle sequenze esogene nello spermatozoo e il suo successivo trasferimento agli embrioni durante la fecondazione. Acquisizione di un totale controllo sperimentale su tale meccanismo. 2) Definizione di protocolli di Transgenesi "inversa" mediata da spermatozoi, in cui l'RNA esogeno sostituisca il DNA nell'interazione con gli spermatozoi per la produzione di animali transgenici. 3) Definizione di protocolli di Terapia Genica embrionale mediata da spermatozoi, utilizzando vettori a DNA o RNA dotati di tropismo cellulare verso specifici tessuti. Lo scopo è di ricostituire il normale genotipo e fenotipo di un embrione mutato utilizzando per fecondare spermatozoi "caricati" del gene specifico *wild type*.

Risultati attesi nel triennio

1) Ruolo della RT endogena nello sviluppo embrionale murino e nella crescita tumorale. 2) Protocolli di transgenesi animale "inversa" in cui l'RNA sostituisca il DNA esogeno. 3) Protocolli di terapia genica e primi risultati sperimentali sul modello murino per la fibrosi cistica.

**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'Agenzia Italiana per il Farmaco e/o dei Dipartimenti dell'Istituto Superiore di Sanità. Consiste nella valutazione 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) di specialità medicinali. Gli aspetti di competenza riguardano in particolare produzioni in asepsi, Saggio di Sterilità, Saggio per la verifica dell'assenza dei Pirogeni e Saggio per la ricerca delle Endotossine batteriche.

Piano triennale

L'attività di valutazione viene svolta dal Settore Biologico su richiesta dell'Agenzia Italiana per il Farmaco e/o dei Dipartimenti dell'Istituto Superiore di Sanità. Consistendo nella valutazione 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) di specialità medicinali. Gli aspetti di competenza riguardano in particolare produzioni in asepsi, Saggio di Sterilità, Saggio per la verifica dell'assenza dei Pirogeni e Saggio per la ricerca delle Endotossine batteriche. Tale attività verrà espletata anche nel corso del triennio 2006-2008

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'Istituto Superiore di Sanità 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'Agenzia Italiana per il Farmaco 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'Agenzia Italiana per il Farmaco e/o dei Dipartimenti dell'Istituto Superiore di Sanità. Importante sarà la verifica della documentazione generata a seguito dell'attività ispettiva svolta sia dagli ispettori nazionali che da *team* di ispettori europei. In caso di *Batch-release* effettuato dall'ISS verranno valutate le problematiche emergenti a seguito di produzione in asepsi con l'esecuzione di Saggio di Sterilità, Saggio per la verifica dell'assenza dei Pirogeni e Saggio per la ricerca delle Endotossine batteriche. Tale attività verrà espletata anche nel corso del triennio 2006-2008.

Controlli biologici su specialità medicinali e presidi medico-chirurgici

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 specialità medicinali e presidi medico-chirurgici 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

La programmazione triennale di questa attività di controllo istituzionale prevede lo stretto collegamento con le fasi di qualifica e convalida realizzate nell'ambito del sistema di qualità del Settore Biologico realizzato al fine di garantire la compliance con quanto previsto dall'accordo di riconoscimento Canada-Europa per il controllo dei farmaci e per le attività di farmacovigilanza. La realizzazione dell'Area di Classe B -dedicata ai controlli di sterilità- permetterà all'ISS di fornire un servizio sempre più qualificato alle Autorità Nazionali e Europee (EQM) coinvolte nelle attività di verifica e, nello stesso tempo, di rispondere a quanto richiesto dal cittadino in termini di sicurezza del farmaco.

Controllo del benessere degli animali da laboratorio utilizzati a fini scientifici

Il Servizio, attraverso le specifiche competenze dei veterinari e del personale tecnico, svolge attività pertinenti all'ottimizzazione della qualità e del benessere degli animali da laboratorio con particolare riguardo alla consulenza tecnico-scientifica e alla vigilanza sulla conduzione delle sperimentazioni relative alla ricerca e ai controlli istituzionali. In tale ambito particolare interesse viene dedicato al controllo di quelle specie animali, quali i primati non umani e le marmotte, che in relazione ai peculiari aspetti della loro biologia e del loro comportamento necessitano specifiche condizioni di stabulazione e di manipolazione. Inoltre, in ottemperanza al Decreto del Ministero della Sanità n. 286/92, il Servizio effettua tutte le attività connesse con la fornitura di animali, mangime, lettiera e farmaci a uso veterinario. Il Servizio gestisce infine le strutture di stabulazione dell'ISS e le attività che in esse vengono svolte.

Controllo del benessere degli animali usati a fini sperimentali

Piano triennale

Anche negli anni successivi verrà attuata attività di controllo sul benessere degli animali stabulati presso l'ISS. Tale attività dovrebbe ampliarsi a seguito della ristrutturazione di un'area preesistente del Settore, nella quale si creerà una sezione per il controllo e la diagnosi degli animali da laboratorio. Il controllo microbiologico verrà ampliata mediante la messa a punto di *test* batteriologici, attuati mediante tamponi nasofaringei, su organi e contenuto intestinale prelevati sempre dagli animali "sentinella", sacrificati a precise scadenze. Tale attività si andrà a completare mediante un'espansione dell'attività di controllo ambientale da attuarsi sulla qualità dell'acqua di abbeverazione e sulle superfici

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'Istituto Superiore di Sanità 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 triennio 2006-2008 verrà redatto il testo definitivo del *Rolling test* che verrà applicato in tutti gli Stati che hanno aderito alla Convenzione Internazionale. In questo programma verranno inserite le attività di controllo che prevedono la verifica delle attività di produzione e di ricerca - effettuate tramite l'impiego di microrganismi geneticamente modificati e *wild-type* -, la visita alle aree classificate secondo gli *standard* di sicurezza internazionale e il controllo della strumentazione tecnico-scientifica che potrebbe avere un *dual-*

use. Questo sistema di verifica delle misure di fiducia e trasparenza garantirà la completa applicazione di quanto indicato nella Convenzione per il bando delle armi biologiche e tossiniche.

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'Istituto Superiore di Sanità e della Segreteria Tecnica per la Farmacopea Ufficiale che si occupano di adeguare al progresso tecnico i protocolli di verifica e controllo delle specialità medicinali.

Piano triennale

L'attività di stesura e aggiornamento al progresso tecnico-scientifico delle monografie in ambito europeo è puntualmente effettuata dai gruppi di revisione e dalle autorità nazionali. Nel corso del triennio il Settore Biologico effettuerà la sua attività di collaborazione e consulenza per la revisione di quelle monografie che impattano sui saggi di propria 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 specialità medicinali e presidi medico-chirurgici, 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 (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. 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, pertanto, la qualità del risultato.

Piano triennale

A fronte di quanto realizzato negli anni precedenti e in *compliance* con quanto previsto dalle norme per i laboratori di prova (UNI/EN/ISO 17025) applicate per la gestione del SAQSB (Sistema di Qualità del Settore Biologico) è stata programmata la revisione e l'aggiornamento delle procedure in fase di scadenza che permettono il mantenimento dell'attività di controllo svolta dal Settore Biologico sulle specialità medicinali e sui presidi medico-chirurgici entro gli *standard* internazionali di qualità.

Ispezione agli stabilimenti di produzione farmaci

L'attività di controllo viene svolta dal Settore Biologico nell'ambito delle attività di valutazione della conformità delle officine farmaceutiche (produttrici di principi attivi e di specialità medicinali) alle buone pratiche di fabbricazione applicabili ai medicinali per uso umano.

Piano triennale

Il triennio 2006-2008 verrà il Settore Biologico impegnato nell'effettuazione di ispezioni congiunte con AIFA ed EQM. In questa progettualità verrà inserita la partecipazione di ulteriori unità di personale che, grazie al programma di formazione espletato nel corso degli anni e all'attività di *training* su campo effettuata, potrà garantire livelli professionali più elevati.

Ispezione campi sperimentali in relazione al rilascio deliberato di organismi geneticamente modificati

Il Settore Biologico partecipa ai lavori della Commissione Interministeriale di coordinamento per le Biotecnologie fin dal 1993, anno di recepimento nel nostro ordinamento della Direttiva Comunitaria 90/220. Successivamente, la nuova Direttiva Comunitaria, recepita con DL.vo 206/01, prevede che l'Autorità Nazionale Competente sia istituita presso il Ministero dell'Ambiente. L'ISS continua a far parte della suddetta Commissione come membro ed esperto. L'attività della commissione prevede, oltre alla valutazione dei *dossier* di notifica delle operazioni di rilascio deliberato su territorio nazionale – sia a fini sperimentali che commerciali –, anche l'attività di controllo al fine di verificare la corretta realizzazione dei protocolli sperimentali.

Piano triennale

Nel corso del prossimo triennio l'attività ispettiva sarà effettuata al fine di verificare la *compliance* dei campi sperimentali con i protocolli sperimentali di rilascio deliberato di OGM (organismi geneticamente modificati) applicati su territorio nazionale e autorizzati dal Ministero della Salute

Parere concernente l'emissione deliberata di organismi geneticamente modificati

Il Settore Biologico partecipa come esperto dell'ISS ai lavori della Commissione Interministeriale di coordinamento per le Biotecnologie fin dal 1993, anno di recepimento nel nostro ordinamento legislativo della Direttiva Comunitaria 90/220. Questa attività prevede la valutazione dei *dossier* di notifica delle operazioni di rilascio deliberato su territorio nazionale - sia a fini sperimentali che commerciali - e la stesura di linee guida per gli operatori del settore. Successivamente, la nuova Direttiva Comunitaria, recepita con DL.vo 206/01, prevede che l'Autorità Nazionale Competente sia istituita presso il Ministero dell'Ambiente. L'ISS continua a far parte della suddetta Commissione come membro ed esperto..

Piano triennale

Nel triennio l'ISS, tramite la partecipazione del Settore Biologico ai lavori della Commissione Interministeriale di Valutazione, presterà la sua competenza tecnico-scientifica alla valutazione delle notifiche di rilascio deliberato e contribuirà alla stesura e all'approfondimento delle norme di settore che vengono redatte in ambito comunitario al fine di garantire uniformità nella sperimentazione e nella commercializzazione di prodotti contenuti o costituiti da OGM in Europa.

Parere concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati

Il Settore Biologico dell'ISS partecipa come membro ed esperto ai lavori della Commissione Interministeriale di Valutazione per l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM). In particolare, nell'ambito del DL.vo 206/01, le attività che prevedono l'utilizzazione di MOGM 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

Si prevede che nel corso del triennio 2006-2008 verranno verificati e adeguati alle nuove conoscenze scientifiche i *format* di notifica redatti per la richiesta di autorizzazione alle operazioni sperimentali che prevedono l'impiego di MOGM. Questo lavoro di revisione critica

uniformerà ulteriormente la stesura delle notifiche e la presentazione delle richieste all'Autorità Nazionale Competente. La partecipazione a gruppi di lavoro istituiti in ambito europeo, permetterà, inoltre, di fornire un ulteriore contributo alla uniformità dell'applicazione della Direttiva Comunitaria sul territorio nazionale.

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 attività vengono richiesti al Settore Biologico valutazioni sia su alcune attività svolte dal personale dell'ISS che su documenti afferenti a tale problematica.

Piano triennale

Tale attività non è programmabile poiché dipende dalle richieste ricevute sia dal Servizio Prevenzione e Sicurezza che dai Dipartimenti dell'ISS.

Valutazione delle richieste di autorizzazione all'utilizzo degli animali a fini sperimentali in deroga agli articoli 8 e 9 del Decreto Legislativo 116/92

Il Settore sperimentazione animale coordina l'attività valutativa, identificando caso per caso i *referee* più adatti sulla base delle specifiche competenze, che è stata affidata dal DL.vo 116/92 all'ISS per tutti i protocolli di ricerca soggetti a preventiva autorizzazione da parte del Ministro della Salute, secondo quanto previsto dagli art. 8 e 9 del suddetto decreto, che riguardano l'utilizzo a fini sperimentali di cani, gatti e primati non umani, l'utilizzo a fini sperimentali delle specie di vertebrati protette dalla Convenzione di Washington, l'utilizzo di vertebrati a scopi didattici e l'esecuzione su vertebrati di esperimenti dolorosi e stressanti senza l'ausilio dell'anestesia. In particolare il personale dirigente del Servizio esprime pareri sulle attività di ricerca riguardanti i seguenti settori della sperimentazione animale: transgenesi e biotecnologie, impiego di cani, gatti e primati non umani e utilizzo di animali a fini didattici e dimostrativi.

**Servizio informatico,
documentazione, biblioteca e attività editoriali**

Attività di ricerca

Applicabilità di *framework* applicativi nella realizzazione del *software*

Un *framework* applicativo è un'“infrastruttura” applicativa che fornisce una serie di componenti *software* generici che collaborano tra loro e che possono essere estesi per fornire particolari funzionalità applicative. I *framework* applicativi disponibili possono essere di tipo commerciale (Microsoft.NET, Oracle User Interface XML - UIX, Oracle Business Component for Java - BC4J) oppure di tipo *open source* (Jakarta Struts, Sun Microsystems JavaServer Faces - JSF). Il progetto consisterà nel confrontare un gruppo selezionato di *framework* applicativi e nell'individuare quelli più idonei alle esigenze di sviluppo applicativo dell'Istituto Superiore di Sanità. Inoltre, nell'eventualità in cui i prodotti disponibili non siano adeguati, verrà valutata la possibilità di costruirne uno *ad hoc*.

Risultati attesi nel triennio

Il processo di riuso dei componenti *software* di un *framework* disciplinato e istituzionalizzato all'interno dell'Istituto Superiore di Sanità porterebbe ai seguenti risultati:

- Standardizzazione delle interfacce applicative e delle modalità di sviluppo;
- Riduzione dei tempi di sviluppo nella produzione degli applicativi;
- Incremento della qualità del *software*;
- Risparmio nei costi di produzione degli applicativi (manutenzione).

Trasferibilità dei risultati

Riutilizzo del codice sviluppato per problematiche applicative simili.

BIBLIOSAN

Progetto del Ministero della Salute, con finanziamento su ricerca corrente, che vede coinvolti ISS, ISPESL, IRCCS, Istituti Zooprofilattici. Tre finalità: 1) creazione di un catalogo unico dei periodici; 2) scambio dei documenti tra i *partner*; 3) realizzazione di una rete per l'accesso condiviso alle risorse elettroniche (periodici, basi dati, *e-books*). Le prime due già realizzate con progetto finanziato con fondi su ricerca finalizzata. La terza da realizzare progressivamente attraverso la creazione di un sistema stabilizzato nel tempo che veda coinvolti gli oltre 50 *partner*. La biblioteca dell'Istituto diviene 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 di ASL e Ospedali

BIOETICA: Raccolta e diffusione dell'informazione tramite un sistema elettronico integrato

Nella prima fase del progetto (anni 2001-2005) 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 stato realizzato un archivio elettronico specialistico di bioetica (www.bioetica.iss.it), il primo in Italia e a tutt'oggi l'unico 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 del SSN, i ricercatori, i cittadini la conoscenza delle problematiche emergenti in bioetica e promuovere la 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
- progettare l'inserimento della 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 e della banca dati già presenti sul sito dell'Istituto

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 *Thesaurus* italiano di Bioetica e, in una seconda fase, di termini equivalenti in lingua inglese

Revisione e integrazione con le note d'ambito (definizioni dei termini) del *Thesaurus* italiano di Bioetica; completamento della sua traduzione in inglese; inserimento nell'ambito di progetti di *thesauri* multilingue

Collegamento ipertestuale al testo completo del documento, ove possibile.

Aggiornamento e mantenimento della banca dati di documentazione in bioetica. Inserimento della stessa all'interno di un sistema informativo europeo, con partecipazione al relativo progetto di ricerca.

Trasferibilità dei risultati

Trattasi di un argomento rilevante nell'attuale contesto scientifico tecnologico e culturale e l'archivio elettronico per l'informazione nel campo della bioetica in Italia, realizzato dal Settore Documentazione, diventa elemento integrante delle molteplici attività dell'ISS i cui ambiti d'azione interagiscono, con evidente attualità, con i problemi sollevati in bioetica. Il sistema informativo integrato realizzato dall'Istituto si proporrà come punto di riferimento per:

Operatori del SSN, per i comitati etici, per i ricercatori

Cittadini (informazione su tematiche al centro del dibattito in bioetica)

Associazioni dei pazienti (bisogni informativi, informazione)

Costituzione di un archivio digitale istituzionale della ricerca, in modalità *open access*

Il Progetto si propone di proseguire l'attività scientifica del Progetto "Aggregazione delle pubblicazioni in campo biomedico", finanziato dall'ISS per gli anni 2004-2005. L'obiettivo è quello di realizzare un modello innovativo di comunicazione scientifica, complementare a quello dell'editoria commerciale, fondato sull'utilizzo libero e gratuito in rete dei risultati della ricerca finanziata da fondi pubblici (modello *open access*). In particolare, verrà realizzato un "contenitore" digitale in cui archiviare le pubblicazioni scientifiche e altre risorse (materiale didattico, video, foto, ecc.), sviluppando le potenzialità del *database* bibliografico costituito in ISS.

Le fasi del Progetto prevedono:

- avvio in produzione del programma *DSpace* per la gestione dell'archivio digitale ISS
- caricamento in *DSpace* dei dati (bibliografici e testuali) relativi alla produzione scientifica di istituzioni *partner* (rete IRCCS), in vista di una condivisione delle risorse a livello nazionale e di una interoperabilità dei sistemi di archiviazione

- controllo di qualità dei dati e attività di *help-desk* a supporto degli utenti
- sviluppo di servizi per la comunità di ricerca (reperibilità, visibilità, identificazione *online* permanente delle risorse, controllo degli accessi, valutazione della ricerca, ecc.)
- analisi della normativa sul *copyright* relativamente a condizioni di autoarchiviazione dei lavori scientifici nell'archivio istituzionale da parte degli autori

Risultati attesi nel triennio

Raggiungimento di una consapevolezza diffusa tra i ricercatori ISS circa i vantaggi della pubblicazione in riviste *open access*, in adesione a logiche di economia ed efficienza della comunicazione scientifica: contrazione delle spese di stampa, visibilità, accessibilità, rapidità, qualità dei processi di *peer review* e di pubblicazione, identificazione permanente delle pubblicazioni in rete.

Costituzione di una *policy* d'Istituto che regoli le procedure di sottomissione dei lavori scientifici nell'archivio istituzionale digitale ISS.

Ruolo di coordinamento dell'ISS nel promuovere la collaborazione tra enti e istituzioni di ricerca in Italia per la costituzione di archivi aperti della ricerca biomedica.

Trasferibilità dei risultati

Acquisizione di logiche condivise tra i *partner* della ricerca in Italia orientate alla pubblicazione dei lavori scientifici in modalità *open access*, attraverso la costituzione di archivi digitali aperti.

Digitalizzazione delle pubblicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità

L'Istituto Superiore di Sanità, nato nel 1934, conserva una preziosa memoria storica che documenta l'evoluzione della sanità pubblica a livello nazionale e, per alcuni settori, anche a livello internazionale. Oggi tutti i principali enti di ricerca, in Italia e all'estero, stanno attivando iniziative di varia natura per documentare la propria storia anche rendendo disponibili *online* pubblicazioni e documentazione, anche di valore testimoniale. Il nostro Istituto, orgogliosamente depositario di ricerche d'eccellenza, ha avviato in questo senso un programma di digitalizzazione volto a recuperare, tra le sue pubblicazioni, quei documenti che meglio rappresentano le attività svolte e il suo prezioso contributo all'evoluzione della scienza. Non dimentichiamo che in Istituto hanno lavorato anche i premi Nobel Enrico Fermi, Ernst Boris Chain e Daniel Bovet che hanno pubblicato i loro contributi scientifici sulla rivista ufficiale dell'Istituto. L'obiettivo del progetto è dunque quello di far emergere la preziosa storia dell'ISS e di offrire allo studioso e al ricercatore un punto di riferimento unico per la storia e le attività dell'ente.

Risultati attesi nel triennio

La prima fase del progetto riguarda la selezione della documentazione disponibile in formato cartaceo, in particolare: i Rendiconti dell'Istituto di Sanità, la prima rivista dell'ente, nata nel 1938, successivamente denominata Annali dell'Istituto Superiore di Sanità; i Rapporti ISTISAN; la Serie Relazioni; il Bollettino Epidemiologico Nazionale, e altre pubblicazioni edite dall'Istituto.

Sulle pagine dei Rendiconti, in particolare, hanno pubblicato non solo tutti i personaggi che hanno reso grande l'Istituto, ma anche scienziati di fama mondiale quali ad esempio i famosi "ragazzi di via Panisperna" (Enrico Fermi, Premio Nobel per la fisica nel 1938, Franco Rasetti, Emilio Segrè, Edoardo Amaldi e Bruno Pontecorvo) e poi Daria Bocciarelli, Mario Ageno, Giulio Cesare Trabacchi. La pubblicazione ha ospitato articoli che vanno dagli studi sull'uranio, alla panificazione delle farine, dalla penicillina alla malaria, e anche illustrazioni e disegni che oggi hanno acquisito un valore artistico oltre che documentale. Preziosissimi frammenti di storia

d'Italia degli anni della guerra e del dopoguerra, gli anni in cui lavorarono in Istituto i due premi Nobel per la Medicina e la Fisiologia: Ernst Boris Chain e Daniel Bovet.

Con gli opportuni finanziamenti si procederà alla scansione di tutte le pubblicazioni ritenute utili per gli obiettivi del progetto e alla successiva organizzazione del sito.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto consentirà di produrre documenti fruibili in Internet e dunque utilizzabili a livello mondiale per studi di natura storico-documentaria sull'attività del principale ente di ricerca sanitaria italiano. La disponibilità di tale documentazione consentirà inoltre di realizzare prodotti specifici (ad esempio *dossier* tematici) per promuovere l'immagine dell'Istituto e rafforzare così la sua visibilità a livello nazionale e internazionale.

Libro Antico

Recupero catalografico e valorizzazione del fondo libri rari della Biblioteca. Il progetto si articola in due fasi: 1) catalogazione informatizzata degli oltre 1000 volumi appartenenti al fondo rari e delle acque minerali, con inserimento delle descrizioni bibliografiche nel programma SEBINA-Libro Antico; 2) digitalizzazione di circa 5000 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 1000 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 (volume a stampa)

Trasferibilità dei risultati

Accessibilità via internet di descrizioni e immagini. Circolazione delle informazioni sui supporti elettronico e cartaceo.

Osservatorio nazionale delle risorse Internet selezionate in biomedicina e sanità pubblica

L'obiettivo primario di questo progetto è quello di realizzare un censimento e selezione delle risorse italiane, presenti in Internet, che si occupano di temi legati alla biomedicina e alla sanità pubblica. Il progetto porterà alla realizzazione di una banca dati che fornirà una fotografia della situazione e una chiave di lettura agli operatori del settore per contribuire allo sviluppo e alla diffusione in Internet delle informazioni di interesse sanitario qualitativamente valide.

Programma di attività e Metodi:

Elaborazione di un *software* per l'archiviazione dei dati.

Ricerca e selezione, in base a criteri di qualità standardizzati e trasparenti, dei siti pubblici e privati comprendenti: istituzioni pubbliche, universitarie e ospedaliere, istituti di ricovero e cura a carattere scientifico, presidi multizonali di prevenzione, associazioni, società scientifiche, ecc.

Descrizione e analisi del contenuto di ogni sito.

Indicizzazione, in italiano e in inglese, delle risorse inserite all'interno dell'osservatorio, tramite parole chiave estratte dal *thesaurus Medical Subject Headings* (MeSH). Raggruppamento tematico di risorse similari, per favorirne la ricerca da parte degli interessati.

Assegnazione di un punteggio o di un'etichetta che certifichi la qualità dei siti analizzati.

Risultati attesi nel triennio

Creazione di una banca dati delle risorse biomediche italiane disponibili in Internet, selezionate tramite una ben definita griglia di valutazione. Completamento della base di dati stessa, con l'inserimento nella stessa di tutte le risorse presenti in rete, con particolare riguardo alle strutture del Servizio Sanitario Nazionale, e alla realizzazione di un sito *web* che renda accessibile a ricercatori, personale sanitario e cittadini il repertorio così realizzato, unico nel suo genere nella realtà italiana.

Questo strumento, una volta completato, costituirà un punto di accesso sistematico a tutta l'informazione sanitaria italiana presente in Internet e quindi una risorsa di qualità per la salute del cittadino e di coloro che lavorano nel settore.

Trasferibilità dei risultati

Ruolo dell'ISS come ente certificatore *super partes*, per la validazione dei siti che si occupano di sanità e per contribuire allo sviluppo e alla diffusione in Internet delle informazioni di interesse sanitario qualitativamente valide e ricercabili con criteri di qualità in un unico sito.

Portale delle Linee Guida italiane in medicina

L'obiettivo primario è quello di realizzare un censimento e selezione delle Linee Guida italiane relative alla medicina, prodotte da Enti governativi e di ricerca, società scientifiche, ecc. presenti in Internet in formato elettronico o in altri formati. Il progetto porterà alla realizzazione di un sito *web* con funzione di portale a tutte quelle risorse che attualmente sono disperse e non ricercabili tramite un unico punto di accesso, per costituire una risorsa di qualità per la salute del cittadino.

Gli obiettivi specifici consistono nel:

Costituire una banca dati di raccolta delle Linee Guida italiane in medicina

Mettere a punto criteri per la valutazione di qualità delle Linee Guida

Fornire agli operatori del SSN accesso a siti nazionali e internazionali contenenti materiale sull'appropriatezza delle prestazioni mediche

Dare 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

Risultati attesi nel triennio

Elaborazione di un programma per l'archiviazione dei dati e realizzazione di un sito *web* sul sito dell'Istituto.

Ricerca delle fonti più autorevoli e accreditate, produttrici di linee guida. Ricerca e selezione delle linee guida disponibili in rete. Ricerca delle linee guida disponibili in altri formati.

Messa a punto di criteri di qualità per la valutazione delle Linee Guida italiane in medicina.

Catalogazione, descrizione e analisi del contenuto di ogni linea guida.

Indicizzazione, in italiano e in inglese, delle linee guida inserite nel portale, tramite parole chiave estratte dal *thesaurus Medical Subject Headings* (MeSH).

Collegamento ipertestuale al testo completo della linea guida, ove possibile.

Creazione di una banca dati delle linee guida italiane. 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 del SSN (riduzione della variabilità assistenziale, confronto con gli obiettivi del PSN-PSR, formazione permanente).

per i pazienti (informazione sulle alternative terapeutiche, condivisione degli obiettivi del SSN).

per le associazioni dei pazienti (bisogni informativi, stato della ricerca).

Trattasi, in definitiva, di un'attività per contribuire allo sviluppo e alla diffusione in Internet delle informazioni di interesse sanitario qualitativamente valide e ricercabili, con criteri di qualità, in un unico sito al pari di altre iniziative realizzate a livello internazionale.

Rete ISS in ambiente *wireless*: ampliamento ed evoluzione

Adeguamento tecnologico e potenziamento della rete dati ISS con l'introduzione del *wireless* attraverso il quale è possibile migliorare la produttività del personale, velocizzare e rendere più efficienti i processi aziendali. Dal punto di vista operativo si ottengono significativi riduzioni dei costi.

Il collegamento è immediato e disponibile da qualsiasi posizione fisica coperta dalla rete senza fili, il personale può restare in contatto da qualsiasi posizione all'interno dell'edificio rimanendo in linea anche durante una riunione o quando lavora lontano dalla abituale postazione.

Consente in breve tempo di rispondere alle diverse esigenze legate alle evoluzioni non programmabili dell'azienda anche per necessità estemporanee.

L'infrastruttura di rete senza fili, a differenza del cablaggio che rappresenta una soluzione permanente, può essere facilmente trasferita in una nuova posizione ad esempio spostata in un nuovo edificio.

Risultati attesi nel triennio

Possibilità di rispondere rapidamente e a costi contenuti alle esigenze di connessione. Facilità di accesso alla rete per il personale dell'ISS e possibilità per gli ospiti di accedere ai servizi di rete in particolare in ambito di convegni, conferenze, corsi e rappresentanza.

Trasferibilità dei risultati

Al termine del lavoro il progetto potrà essere utilizzato da strutture o enti con caratteristiche simili.

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.

Risultati attesi nel triennio

Eliminazione degli incidenti dovuti a 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 dell'Istituto Superiore di Sanità: i protagonisti silenziosi raccontano

Il progetto intende ricercare e ripercorrere, attraverso documentazione scritta e testimonianze orali, la storia non detta dell'Istituto Superiore di Sanità, quale lettura alternativa della storia della sanità pubblica italiana e spaccato di vita romana del secolo scorso. A tal fine si prevede di realizzare prodotti testuali e multimediali che documentino la storia "non ufficiale" dell'Istituto recuperata attraverso racconti, interviste, fotografie, ricordi e oggetti in possesso dei dipendenti ISS, soprattutto i più anziani o pensionati, o di altre persone che hanno dedicato all'ISS il proprio lavoro e parte della propria vita. I prodotti realizzati consentiranno di promuovere l'immagine dell'ente sia a livello nazionale che internazionale, rappresentando in modo originale la sua preziosa storia e rafforzando la consapevolezza, di tutti coloro che lavorano o hanno lavorato al suo interno, di essere protagonisti nell'espletamento della *mission* dell'ente. L'interesse a documentare la storia dell'Istituto Superiore di Sanità e più in generale della sanità pubblica 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.

Risultati attesi nel triennio

La prima fase riguarda una attenta ricerca e selezione di materiale di varia natura utile a documentare la storia dell'ISS attraverso fonti diverse, scritte (documentazione e fotografie possedute dall'ISS, o facenti parte di collezioni private, archivi istituzionali o di altri enti che hanno collaborato con l'Istituto) e orali (interviste registrate e trascritte e riprese video). Al fine di organizzare e rendere disponibile il materiale raccolto sarà utilizzata una teca multimediale, appositamente creata, contenente immagini, filmati, poster, fotografie di strumenti scientifici e altri oggetti di interesse storico-documentario. La teca sarà disponibile in Intranet, e successivamente anche in Internet. Il campione di persone da intervistare (ricercatori, tecnici o personale ausiliario) sarà attentamente selezionato in base a rappresentatività, disponibilità e ricchezza di ricordi tali da rappresentare, con originalità e da diverse angolazioni, la storia non scritta dell'ISS.

La seconda fase riguarderà l'organizzazione e selezione del materiale raccolto perché possa essere presentato nel modo più efficace e su supporti diversi, sia all'interno che all'esterno dell'ISS, in ambito locale, nazionale e internazionale. È prevista una sintesi in inglese delle testimonianze più significative.

Trasferibilità dei risultati

I prodotti realizzati consentiranno di offrire una visione retrospettiva e inedita della vita in Istituto, testimone dello sviluppo della sanità pubblica italiana, e allo stesso tempo uno spaccato di vita italiana nel secondo '900 tramite la realizzazione di:

- uno o più volumi a stampa e CD contenenti la più significativa documentazione raccolta;
- brevi documentari a tema;
- una mostra fotografica;
- organizzazione di un convegno in cui venga presentato il materiale prodotto e nel quale intervengano gli stessi "protagonisti silenziosi" a raccontare direttamente le proprie storie.

Traduzione italiana dei MeSH (*Medical Subject Headings*)

I MeSH (*Medical Subject Headings*), ampiamente conosciuti a livello internazionale, costituiscono il vocabolario/*thesaurus* di oltre 23.000 termini/parole chiave/descrittori prodotto e gestito dall'NLM (*National Library of Medicine*) di Bethesda, USA. La traduzione italiana dei MeSH è stata realizzata dal Settore Documentazione nell'ambito di una collaborazione tra l'ISS e l'NLM e in seguito ad un accordo stipulato, nel 1978, tra il governo italiano e quello

statunitense. Da allora, il Settore Documentazione dell'ISS risulta altresì Centro di riferimento per il sistema MEDLARS (*Medical Literature Analysis and Retrieval System*), a livello nazionale.

Detta traduzione nasce nel quadro del progetto UMLS (*Unified Medical Language System*) avviato dall'NLM, nel 1986, per la creazione di un linguaggio medico standardizzato e accessibile universalmente attraverso i sistemi informativi computerizzati. Ad oggi sono 26 le nazioni che hanno effettuato e reso accessibile la loro traduzione.

L'NLM cura la produzione e l'aggiornamento di questo vocabolario medico, conosciuto a livello internazionale soprattutto come strumento sia per l'indicizzazione, ovvero la descrizione dei contenuti di un articolo/documento attraverso parole chiave, sia per la ricerca dello stesso articolo/documento nella base dati PubMed (<http://pubmed.gov>) e altri archivi e basi di dati dell'NLM.

La traduzione italiana dei MeSH, iniziata nel 1998, è stata ultimata, nell'ottobre 2004 nella sua versione elettronica, in collaborazione con il Settore Informatico. I MeSH sono attualmente utilizzati dalla Biblioteca dell'ISS per la catalogazione delle pubblicazioni e il loro utilizzo è suggerito da vari editori per l'assegnazione delle parole chiave ai lavori scientifici. Infine sono utilizzati in ISS per l'attribuzione di parole chiave alle attività svolte da Dipartimenti, Centri e Servizi in fase di progettazione e di rendicontazione annuale e triennale.

Risultati attesi nel triennio

I termini controllati MeSH, riuniti concettualmente in quindici categorie, 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 dell'NLM, che ne valuta l'eventuale inserimento nel *thesaurus*. Ogni anno è pubblicata una versione aggiornata dei MeSH: i nuovi descrittori previsti per l'anno 2006 sono oltre mille.

Dal mese di ottobre 2004 la traduzione italiana dei MeSH è consultabile gratuitamente, previa registrazione, sul sito dell'ISS (www.iss.it/sitp/mesh), attraverso un'interfaccia *web* appositamente creata. In questo primo anno di accessibilità *web* risultano visitate oltre 21.000 pagine da parte di un'utenza appartenente soprattutto a: Enti di ricerca, Università e strutture del Servizio Sanitario Nazionale.

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 30/03/2005; la tariffa è differenziata per diverse modalità di utilizzo e tipologie di utenza. Il sito deve essere aggiornato annualmente con l'inserimento dei nuovi descrittori e della relativa traduzione. Inoltre deve essere effettuata la revisione di vaste aree tematiche, come ad esempio quella delle sostanze chimiche e farmaci, secondo gli sviluppi della terminologia scientifica.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto AZALEA, di Alleanza contro il cancro, è stato il primo utente esterno all'ISS a richiedere l'autorizzazione a utilizzare 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 potranno utilizzare questo strumento di standardizzazione del linguaggio biomedico per rendere più facilmente fruibili al pubblico i risultati della ricerca, da un lato, e rendere possibile la ricerca di informazione sanitaria per il cittadino e il paziente, dall'altro. La traduzione italiana dei MeSH si inserisce quindi 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 auspicabile pertanto la diffusione di questo progetto tra gli operatori del Servizio Sanitario Nazionale, attraverso la realizzazione di un Convegno pianificato per il 2006 e 2008 e corsi di formazione per insegnare l'utilizzo dei MESH e le modalità e i criteri per l'interrogazione di PubMed.

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'introduzione di questa tecnologia porterebbe a una sostanziale semplificazione della gestione e della manutenzione della telefonia in Istituto.

Trasferibilità dei risultati

Le specifiche del progetto potranno essere applicate a strutture o enti con problematiche simili.

**Servizio informatico,
documentazione, biblioteca e 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 Buona Pratica di Laboratorio 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

Al fine di facilitare l'attività di controllo si ritiene indispensabile stabilire degli *standard* per la presentazione della documentazione da allegare alla richiesta per l'ispezione per quanto riguarda specificamente la sicurezza informatica. Tali suggerimenti saranno presentati agli organismi nazionali e internazionali di riferimento.

Ufficio per le Relazioni Esterne

Attività di ricerca

Formazione professionale in Salute Pubblica tra Istituto Superiore di Sanità 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 definirà e selezionerà 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 porterà 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.

Ciclo di conferenze e manifestazioni divulgative relativamente ad attività di interesse sanitario europeo

Il progetto, realizzato in convenzione con il Ministero della Salute, prevede la realizzazione di conferenze, convegni e altri eventi seminari relativi alla promozione e alla protezione della salute, realizzati in forma residenziale, con la partecipazione di entità europee e in coordinamento con le articolazioni più appropriate della Commissione e del Parlamento europei.

Si tratta di azioni svolte nel contesto delle campagne di informazione e comunicazione, tra cui la promozione dell'esercizio fisico, il controllo della diffusione di consumi di sostanze nocive per la salute, l'uso del farmaco e similari, su indicazione del Ministero della Salute.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione delle conoscenze e delle attività programmatiche che vengono progettate ed eseguite presso i vari Stati membri, a cui garantire visibilità e valore aggiunto europeo.

Trasferibilità dei risultati

L'obiettivo implicito del progetto è l'identificazione di modelli di comunicazione e divulgazione di eccellenza, attraverso la migliore conoscenza e valorizzazione delle prassi impostate dagli Stati membri e dalla Commissione europea.

Collaborazione tecnico-scientifica per la realizzazione di Documento di Indirizzo per la promozione della salute nella scuola

È prevista la realizzazione di un Documento di Indirizzo sulla promozione della salute nella Scuola da parte di un gruppo di lavoro costituito presso l'Istituto Superiore di Sanità e composto da Ricercatori, Operatori di promozione della salute del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, dell'Agenzia di Sanità Pubblica della Regione Lazio, della Provincia di Roma, dei Dipartimenti di Prevenzione delle ASL e dei Docenti Referenti della Scuola. Il coinvolgimento delle varie tipologie di soggetti si sviluppa in un'ottica di approccio globale e integrato per la diffusione di comportamenti corretti e consapevoli nella popolazione scolastica.

Lo scopo del gruppo è quello di sviluppare la tematica della promozione della salute nella scuola e produrre materiale didattico per gli insegnanti, gli studenti e i genitori. Nel primo anno la sperimentazione dei prodotti didattici e della metodologia di intervento sarà effettuata su un campione di nove istituti scolastici della scuola media superiore e successivamente estesa a tutte le scuole del territorio di ogni ordine e grado.

Tale attività si rende necessaria al fine di analizzare e proporre una metodologia di intervento basata su prove di efficacia e su esperienze di promozione della salute valide e sperimentate.

L'iniziativa prevede la formazione di sette sottogruppi tematici che, dopo aver censito le esperienze già maturate nella scuola, formulino e mettano in atto obiettivi prioritari e metodi innovativi di promozione della salute nella scuola nelle seguenti aree: Alimentazione, Dipendenze, Igiene e prevenzione, Incidenti stradali, Incidenti domestici, Salute mentale, Sessualità.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppare le *life skills* ovvero le abilità e competenze psicosociali, definite dall'OMS

Migliorare le conoscenze relativamente ai comportamenti presi in esame e alle potenziali conseguenze nocive sul fisico e sulla psiche.

Ridurre i comportamenti a rischio.

Trasferibilità dei risultati

I materiali e i metodi sperimentati e validati sul campione rappresentativo consentiranno una elevata qualità e riproducibilità su tutto il territorio nazionale.

Collaborazione Tecnico–Scientifica per la realizzazione di un Documento di Indirizzo sugli aspetti comunicativo-relazionali per chi opera in oncologia

Realizzazione di un documento di indirizzo sugli aspetti relazionali dell'accoglienza in oncologia al fine di migliorare le competenze degli operatori socio sanitari delle strutture pubbliche e del privato sociale nell'assistenza dei malati oncologici.

La formazione alle abilità comunicative e alle competenze relazionali, spesso, non rientra nel *curriculum* formativo degli operatori che dovrebbero essere supportati anche da linee guida di comportamento in merito a situazioni particolari. A tale proposito si è costituito un gruppo di lavoro, composto da esperti del settore, allo scopo di realizzare un documento di indirizzo sulla qualità della relazione professionale e sulle capacità di accoglienza da parte di chi assiste il malato oncologico (Enti coinvolti: ASL del territorio nazionale, Associazioni di volontariato, Reti oncologiche regionali, Università degli Studi, Assessorati alla Sanità regionali, Ministero della Salute).

Risultati attesi nel triennio

Il documento che ne deriverà sarà composto da due parti e costituirà uno strumento di valutazione e auto-valutazione delle competenze degli operatori socio sanitari delle strutture pubbliche e del privato sociale che assistono i malati oncologici.

La prima parte del documento sarà formulata sotto forma di autovalutazione attraverso criteri raggruppati in "Riquadri" riguardanti specifici aspetti di buona qualità della comunicazione col malato oncologico e con i suoi familiari. Nella seconda parte si specificheranno i criteri approfondendo gli aspetti psicologici, relazionali, e comunicativi della normativa, dell'organizzazione, della formazione, dell'etica, del rispetto della *privacy* e dell'umanizzazione dell'assistenza.

Trasferibilità dei risultati

Comunicazione delle emergenze e dei rischi sanitari alla popolazione generale

Il progetto, realizzato in convenzione con il Ministero della Salute, prevede la realizzazione di modelli di comunicazione rivolti alla popolazione generale e a gruppi particolarmente esposti per motivi professionali al rischio sanitario. Si tratta anche di impostare una metodologia informativa consistente e continuativa relativamente alle emergenze e alle catastrofi. Per quanto concerne il rischio di attacchi terroristici, l'ISS si avvarrà delle previsioni di collaborazione istituzionale con gli NIH statunitensi e, in particolare, della *National Library of Medicine*, che ha messo a punto un programma di promozione e guida della comunicazione tra medicina di base e utenza, e dei CDC, con cui è stata già avviata una linea di collaborazione specifica sulla gestione mediatica degli eventi acuti, anche di natura, infettivologica emergente.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione delle abilità e competenze relative alla gestione della comunicazione e dell'informazione istituzionale e specifica tra i professionisti della salute per progettare, organizzare e valutare campagne informative relative alla gestione del rischio su tutto il territorio nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di metodologie efficaci, validabili e replicabili in tema di rischio sanitario, sia a livello di esposizione professionale, che a livello di gestione dell'informazione e degli strumenti mediatici rivolti alla popolazione generale.

Comunicazione tra medico e paziente, medici e famiglie, infermiere e paziente

Affrontare il problema della comunicazione interpersonale fra i professionisti sanitari e il cittadino-utente e la sua famiglia apre vasti scenari di contesti diversificati e multiprofessionali che coinvolgono molte discipline e che devono essere affrontati con una progettazione complessa che si basa su una fase di analisi dei fabbisogni per concludersi con una valutazione dell'efficacia del progetto globale definita dal suo successivo obiettivo, ovvero dal miglioramento della *compliance* del cittadino-utente e dall'aumento dei livelli di confidenza e utilizzazione dei servizi da parte dello stesso. In una prospettiva a medio e a lungo termine è necessario anche prevedere una valutazione del possibile miglioramento dello stato di salute e dell'appropriatezza dei comportamenti con impatto sanitario da parte del cittadino direttamente correlabili con il miglioramento dei livelli di comunicazione.

Risultati attesi nel triennio

Per evitare un approccio verticale e non contestualizzato della formazione erogata, ancorché sperimentale e di livello prototipale, e favorire, invece, un percorso partecipativo e rilevante, ci si propone di procedere secondo le fasi di seguito descritte, che rappresentano i risultati attesi di ciascuna fase di articolazione del progetto:

Ricognizione preliminare dei profili dei destinatari, delle loro esigenze, del loro fabbisogno formativo rispetto agli obiettivi di progetto e rispetto ai livelli di conoscenza e di competenza comunque presenti

Valutazione dell'impatto organizzativo atteso nell'ambito professionale specifico, definito per macro-categorie (medicina generale, pediatria di libera scelta, *front-office* clinico, servizio infermieristico domiciliare e ospedaliero)

Ricognizione del livello di alfabetizzazione informatica dei destinatari della formazione e della loro dotazione elettronica (*hardware*, *software*, linee di comunicazione e telefonia fissa e mobile), in particolare delle strutture e infrastrutture tecnologiche (*server*, rete, postazione individuale) disponibili in funzione degli interventi di formazione realizzabili e dei relativi costi

Adozione della metodologia più idonea a realizzare l'interattività, la multimedialità e la collaborazione tra i diversi soggetti interessati, tenendo conto del ruolo attivo dell'utente e dell'importanza e della necessità di un lavoro tecnico e didattico basato sul lavoro di gruppo e quindi sulla classe virtuale implementata in modalità sincrona

Potenziamento delle strutture tecnologiche (*server*, rete e postazioni di lavoro), in modo da garantire un'adeguata erogazione e fruizione dei contenuti multimediali;

Creazione e gestione di materiale didattico innovativo, strutturato in "unità autoconsistenti" (moduli formativi), riutilizzabili in varie combinazioni da inserire nella piattaforma FAD (*Learning Object*) e realizzazione di griglie di analisi e osservazione per la valutazione delle abilità comunicativo-relazionali degli operatori.

Migrazione dei contenuti e dei processi FAD dall'attuale piattaforma proprietaria a tecnologia non proprietaria, mantenendo e potenziando la disponibilità di componenti *software* interoperabili, in grado di registrare il percorso delle attività del discente e di permettere anche l'interazione tra discenti (comunità virtuale)

Monitoraggio continuo del progetto e del processo di *e-learning*, nonché alla valutazione del livello professionale dei partecipanti.

Queste fasi si originano dalle linee guida del CNIPA (Centro Nazionale per l'Informatica nella Pubblica Amministrazione), che definisce *standard*, metodologie e *benchmarking* di qualità per la FAD nella Pubblica Amministrazione, a cui si ritiene necessario allinearsi nell'affrontare argomenti di rilevanza nazionale indicati dal Ministero della Salute. La compatibilità con le linee guida del CNIPA, infatti, conferisce all'offerta formativa una struttura organizzativa validata dal punto di vista metodologico e tecnologico per lo sviluppo di progetti FAD, compatibile con lo *standard* atteso dalla Pubblica Amministrazione.

L'approccio didattico privilegia una lettura integrata dei diversi contenuti di cultura scientifica medica, antropologica, psicologica, sociologica e economica per fornire al professionista sanitario gli strumenti di interpretazione più adatti ad analizzare e gestire il percorso di salute del proprio utente interagendo con lo stesso e la propria famiglia nel contesto culturale e sociale di provenienza, promuovendone la coscienza e l'autonomia decisionale.

Il corso è composto da 14 moduli didattici erogati nell'arco di sei mesi e suddivisi secondo le seguenti tipologie:

Un modulo didattico principale (semantica generale e basi metodologiche)

13 moduli didattici specialistici (relativi alla comunicazione in situazioni critiche: dalla gestione del *counselling* in fasi terminali della vita, alla relazione con il disabile politraumatizzato, alla comunicazione di eventi avversi, del rischio clinico, della patologia cronica inaggravante e disabilitante).

Nel rispetto della metodologia didattica proposta ogni modulo formativo è composto da un numero variabile di unità didattiche. Ognuna è proposta secondo un approccio metodologico esperienziale basato su problemi rilevanti per calare il partecipante in un contesto realistico di riferimento e stimolarne il confronto con esperienze vissute di guida per la formulazione di idee risolutive.

Trasferibilità dei risultati

Con il sistema open source che l'ISS adotterà si punta a promuovere:

L'accesso a un numero elevato di operatori sanitari organizzati per categoria professionale, per tipologia di apprendimento (informazione, FAQ, linee guida e istruzioni operative, aggiornamento, formazione)

La distribuzione e la copertura delle attività a distanza

Livelli di sicurezza e di affidabilità

L'integrabilità di varie forme di didattica e aggiornamento

La creazione di una banca dati formativa accessibile da parte degli operatori interessati sia in modalità asincrona che sincrona

La valorizzazione delle *best practices* settoriali, rese disponibili all'uditorio nazionale in tempi brevissimi

Il contatto con analoghi siti a livello internazionale

La possibilità di attivare una rete di sorveglianza e gestione dell'informazione, oltre che a sviluppare e integrare nuove funzionalità di "comunità di apprendimento" e a predisporre un sistema standardizzato e automatizzato per la realizzazione di corsi multimediali.

Con la piena applicazione di questa strategia di erogazione si ritiene di poter garantire la completa "portabilità" del sistema e un impatto vasto e positivo rispetto alla maturazione di una cultura e di una semantica comune in un ambito molto spesso oggetto di formazione non sistematica, occasionale e frammentata.

Corso di specializzazione biennale per formatori socio-sanitari in collaborazione con l'Università Pontificia Salesiana

L'introduzione dell'obbligo formativo per il personale sanitario con il decreto legislativo n. 229/99 e l'accreditamento di strutture di formazione al progetto ECM (Educazione Continua in Medicina) richiedono la presenza di formatori e di organizzatori che posseggano solidi requisiti di competenza nell'elaborazione di progetti formativi e nell'utilizzazione di metodologie e tecniche didattiche coerenti con i principi della formazione dell'adulto (andragogia). A questo proposito, la Scuola Superiore Internazionale di Scienze della Formazione di Mestre (Università Pontificia Salesiana), in collaborazione con l'ISS e con l'Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli" di Pordenone organizza un corso biennale di specializzazione per formatori

professionali in ambito socio-sanitario, che intende offrire una risposta qualificata a tale domanda di formazione.

Il percorso formativo si qualifica per alcune caratteristiche distintive:

L'acquisizione di conoscenze, atteggiamenti e abilità pertinenti ai compiti del professionista di formazione nel settore socio-sanitario,

L'utilizzo di metodi didattici appropriati alla formazione degli adulti, quali il *Problem-based Learning* (PBL).

La valutazione continua dell'apprendimento e della qualità didattica.

La possibilità di conseguire un Diploma Universitario di Specializzazione o di Qualificazione.

Il Corso si rivolge prioritariamente a quanti operano come formatori e come coordinatori di interventi formativi in ambito socio-sanitario, in particolare nel SSN (dal livello Regionale al livello di Azienda sanitaria o Dipartimento/Unità operativa) e in altri enti o associazioni che promuovono e tutelano la salute dei cittadini.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione delle abilità e della cultura di progettazione, erogazione e valutazione di formazione in sanità pubblica accreditabile secondo i sistemi ECM nazionale e regionali.

Applicazione del sistema di gestione di qualità e Miglioramento Continuo di Qualità al percorso formativo con identificazione di strumenti per la valutazione della ricaduta formativa sulla professione e applicazione di metodi didattici conformi ai principi dell'andragogia.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di un percorso metodologico di formazione dei formatori basato sull'utilizzo di metodi andragogici validati dall'ISS trasferibili ad altre realtà istituzionali di formazione sanitaria sul territorio nazionale.

Informazione e sensibilizzazione rivolta alla popolazione anziana sui servizi socio-sanitari per la promozione di corretti stili di vita

Il progetto, in convenzione con il Ministero della Salute, si propone di:

sostenere la messa in rete delle conoscenze e competenze tra le organizzazioni e le istituzioni impegnate a vari livelli nella promozione della salute e prevenzione delle patologie cronicodegenerative per le popolazioni anziane;

fornire strumenti per identificare la rete relazionale e socio-sanitaria dell'anziano con il suo contesto di riferimento.

Tali obiettivi potranno essere raggiunti grazie a un'attività di mappatura delle iniziative esistenti e a una specifica attività di formazione. La componente formativa/informativa è rivolta ai medici di medicina generale (operanti soprattutto a livello di casa di riposo e residenze assistenziali) e agli operatori socio-sanitari, concentrandosi prevalentemente sulla promozione della salute e prevenzione delle patologie cronicodegenerative o aventi potenziale impatto acuto sulla fragilità. L'azione formativa intende mettere in grado i professionisti partecipanti di progettare, organizzare e valutare opportune campagne e attività di promozione della salute e prevenzione delle patologie cronicodegenerative per le popolazioni anziane.

Risultati attesi nel triennio

I destinatari del progetto saranno in grado di progettare, organizzare e valutare appropriate campagne e attività di promozione della salute e prevenzione delle patologie cronicodegenerative per le popolazioni anziane. I beneficiari finali del progetto avranno la possibilità di identificare le risorse di sistema più appropriate per poter fruire di informazioni e assistenza relativamente alla protezione del proprio livello di salute.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di percorsi di formazione per mettere in grado i professionisti della salute pubblica di progettare, erogare e valutare efficaci campagne e attività volte a promuovere stili di vita salutare e a prevenire le patologie cronico-degenerative per le popolazioni anziane.

La formazione istituzionale certificata e il miglioramento continuo di qualità

La funzione formativa istituzionale dell'ISS si fonda su un preciso mandato di legge, una costante domanda da parte delle strutture del SSN e una rete di collaborazioni con amministrazioni sanitarie regionali, strutture locali e enti di formazione di eccellenza.

La certificazione del sistema di gestione di qualità a norma UNI EN ISO 9001:2000 dei corsi istituzionali è stata conseguita dall'anno 2004 e rinnovata con successo per il 2005 e per il 2006. L'aderenza a detta norma ha posto le basi per avviare, in maniera documentata e strutturata, un processo di Miglioramento Continuo della Qualità (MCQ) del piano formativo istituzionale che assicuri percorsi di formazione continua efficaci e rispondenti alle esigenze degli operatori della sanità pubblica, a garanzia della qualità dell'assistenza prestata ai cittadini.

Il processo di MCQ si basa sull'identificazione e monitoraggio di una serie di obiettivi di qualità e relativi indicatori e standard di soddisfazione. Ogni anno il sistema di indicatori e gli *standard* vengono riesaminati in base ai risultati conseguiti (Riesame della Direzione). Su tale riesame si fonda, annualmente, la produzione di un nuovo Piano di Miglioramento. Il processo di MCQ viene costruito e condiviso con tutte le strutture dell'ISS coinvolte nella funzione formativa istituzionale anche attraverso riunioni formali organizzative e processi di formazione interna specificatamente elaborati e proposti.

Risultati attesi nel triennio

A livello di ente: il processo condiviso di MCQ, genera un apprendimento organizzativo-tecnico-scientifico che è patrimonio stesso dell'organizzazione (*Learning Organization*).

A livello di risorse umane dei Dipartimenti ISS: il personale dell'ISS, generalmente specialista in ricerca in sanità pubblica, migliora le proprie *performance* e conoscenze nell'ambito della funzione formativa che è chiamato a svolgere.

A livello dell'Ufficio Relazioni Esterne: l'ufficio competente per la formazione istituzionale (URE) acquisisce competenze dirette nei processi di certificazione della formazione in sanità pubblica.

A livello delle strutture del SSN: l'esperienza accumulata dal personale ISS viene trasferita alle strutture del SSN (Uffici di formazione delle Aziende sanitarie) grazie all'erogazione di corsi specifici sul tema della certificazione anche in collaborazione con Università o altre istituzioni di formazione nazionali e internazionali.

A livello di destinatari della formazione ISS: i partecipanti ai corsi ISS beneficiano di una sempre maggiore attenzione alle loro esigenze di formazione continua (a livello di sviluppo professionale e di fruizione e accesso alla funzione formativa).

Trasferibilità dei risultati

L'esperienza acquisita dalle attività di progetto viene trasferita alle strutture e al personale del SSN tramite pubblicazioni, consulenze e corsi specifici, anche a livello di specializzazione o Master universitari. In questi ultimi due casi includendo tra i formandi anche giovani professionisti e neo-laureati.

La realizzazione del museo digitale della ricerca biomedica

L'Ufficio Relazioni Esterne, grazie al contributo di finanziamenti per i progetti di ricerca corrente assegnati per il riordino e il censimento di materiali posseduti dall'Ente ha sviluppato

procedure di recupero, restauro, riordino, catalogazione e presentazione dei materiali deperibili e della strumentazione dismessa di valore storico immagazzinata in vari settori dell'ente.

Si sono sviluppate azioni legate alla salvaguardia del patrimonio storico dell'ISS, quali la catalogazione della strumentazione scientifica e la digitalizzazione della collezione fotografica dell'ISS, visto anche il DL.vo 22 gennaio 2004 (n. 41, art. 10) che ha riconosciuto alle fotografie e ai materiali fotografici lo *status* di "bene culturale" da tutelare e conservare.

L'attenzione all'innovazione tecnologica, che permette l'utilizzazione di nuove strumentazioni e procedimenti, identifica il contenitore ideale per le realizzazioni sin qui garantite e per il futuro del settore in un museo digitale della ricerca biomedica (MDRB), da perseguire anche attraverso la piena realizzazione del protocollo d'accordo tra l'ISS e la *National Library of Medicine* degli NIH statunitensi.

La struttura del museo digitale della ricerca biomedica prevede:

Collezione immagini. - La sezione sarà dedicata all'archivio fotografico digitale costituito ad oggi da 10.000 fotografie (di cui 6000 digitalizzate).

Collezione illustrazione e disegni. - La sezione sarà dedicata alle illustrazioni e ai disegni realizzati in occasione della costruzione dell'ISS.

Collezione strumenti biomedicali. - La sezione sarà dedicata alla strumentazione scientifica dell'ISS.

Collezione documentazione storica. - La sezione sarà dedicata alla digitalizzazione di testi scientifici, manoscritti, monografie sulla storia della scienza, della medicina, della sanità pubblica nazionale e internazionale.

Risultati attesi nel triennio

In Italia esiste una buona tradizione di collezioni storiche dislocate presso istituti di ricerca, enti, università.

Esse raccolgono l'antica strumentazione esistente o dispersa, ma rintracciabile attraverso procedure di indagine museale supportata dalla digitalizzazione dei materiali e dalla loro pubblicazione in varie sedi, nazionali ed estere. La tradizione trova consolidamento nell'opportunità di conservare e curare collezioni di particolare valore, legata a scienziati del passato o a scuole di pensiero attive in un particolare contesto.

Alcune strutture hanno in corso un vasto programma di realizzazione di archivi digitali relativi ai reperti scientifici in modo da costituire una base dati consultabile anche a distanza per studi e ricerche. L'accesso alle intere collezioni di oggetti in modalità digitale costituisce un potente strumento didattico.

Il museo digitale della ricerca biomedica fonde insieme tradizione e innovazione, svolgendo (parallelamente all'attività di conservazione e presentazione delle collezioni) le seguenti attività:

Ricerca e studio sulla storia della scienza e della sanità pubblica

Formazione (rivolta con attenzione soprattutto al pubblico giovanile) con sezioni a tema dal titolo:

- "la città della salute" i cui moduli didattici sono dedicati all'educazione, all'informazione e all'orientamento per acquisire corretti stili di vita fin dall'infanzia;
- "la città del sapere" medicina, biotecnologie, sanità, ambiente, nuove tecnologie dell'informazione, informatica e comunicazione (opere divulgative, cataloghi delle raccolte, conferenze, scambi di materiale con altre Istituzioni similari nazionali e internazionali).

Trasferibilità dei risultati

Le visite virtuali ai musei dotati di un sito *web* sono in crescita esponenziale e hanno già superato il numero di visite reali verso gli stessi musei.

In alcuni casi, l'apertura di un sito *web* museale ha preceduto l'apertura del museo reale. In altre situazioni, può essere interesse dell'ente di rendere accessibili gli oggetti virtuali, poiché

quelli reali sono di difficile consultazione, fragili, soggetti a usura, non disponibili per problematiche legate all'inadeguatezza delle strutture espositive e divulgative.

Il digitale non è la soluzione ai problemi di conservazione del materiale originale, ma un utile strumento e un'alternativa per facilitare l'accesso agli originali. Il museo digitale della ricerca biomedica intende raccogliere e esporre oggetti e strumenti relativi alle discipline scientifiche che costituiscono l'insieme della sanità pubblica, allo scopo di documentare l'attività e le metodiche in uso nel passato, oltre che preservare e mettere in mostra oggetti di valore intrinseco.

L'esposizione di tali materiali non si svolgerà secondo modalità tradizionali. Le collezioni saranno digitalizzate e fruibili via *web*. Non si limiteranno a fornire un duplicato di quanto è possibile trovare nel luogo fisico reale del museo o della struttura in cui la collezione è conservata, ma ripenseranno la collezione tenendo conto dell'opportunità della semantica del *web*. Attraverso studi di caso saranno sviluppate strategie di valutazione per comprendere quali metodologie utilizzare, quali possono essere i ruoli rivestiti dal museo digitale e quale sia la tipologia dei visitatori virtuali.

Master di Diritto, Economia e Management delle Aziende Sanitarie

In un contesto in cui il processo di aziendalizzazione del sistema sanitario italiano è ormai in fase avanzata e in previsione dell'avvio del processo di riforma federale (*devolution* sanitaria), si avverte, da parte di sempre più numerose realtà aziendali sanitarie italiane, l'esigenza di avviare percorsi formativi completi e avanzati al fine di interpretare al meglio gli obiettivi di economicità ma anche di responsabilizzazione, *empowerment* e miglioramento continuo che l'aziendalizzazione pone. In particolar modo, nel contesto sanitario è indispensabile formare i Dirigenti sanitari e amministrativi sia sotto il profilo tecnico, che teorico-organizzativo, anche in considerazione della crescente eterogeneità delle competenze professionali del SSN che si caratterizzano per elevata specializzazione.

Spiccate doti di *leadership* e di mediazione da parte del personale dirigenziale, inoltre, appaiono fondamentali al fine di risolvere problemi e controversie che da sempre sono presenti nei rapporti fra personale clinico e amministrativo. Al fine di affrontare tali problematiche, l'Università LUM Jean Monnet, insieme all'Istituto Superiore di Sanità ha ritenuto di proporre un percorso formativo congiunto, inteso come una serie di momenti formativi condivisi fra i dirigenti sanitari e amministrativi, oltre che dal personale dirigenziale infermieristico e di altre categorie professionali, al fine di consentire l'apprendimento di un linguaggio comune e di migliorare l'approccio alla soluzione dei problemi. Il programma didattico del *Master* è articolato in moduli residenziali, e in uno *stage* formativo condotto presso aziende o servizi sanitari pubblici o privati accreditati. I contenuti afferiscono a tre aree principali: il contesto normativo e sociale, Economia e *Management* in sanità (Pianificazione, direzione e organizzazione) e Strumenti di gestione e controllo.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione delle abilità e della cultura manageriale nel contesto specifico dell'Azienda sanitaria a livello apicale e intermedio. Applicazione del sistema di gestione di qualità e Miglioramento Continuo di Qualità al percorso formativo con identificazione di strumenti per la valutazione della ricaduta formativa sulla professione e applicazione di metodi didattici conformi ai principi dell'andragogia.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di un percorso metodologico di formazione manageriale validato dall'Istituto Superiore di Sanità e trasferibile ad altre realtà istituzionali di formazione sanitaria in area Centro e Nord Italia e nel bacino del Mediterraneo.

Master Internazionale sui Determinanti Socio-Economici della Salute e Master in Sanità Pubblica

Attingendo alla prestigiosa e prolungata esperienza dell'ISS e dell'Istituto di Igiene dell'Università La Sapienza nell'organizzazione di *Master* internazionali in ambito socio-sanitario, i percorsi *Master* rispettivamente dedicati ai determinati socio-economici della salute e, più tradizionalmente, ai temi della sanità pubblica verranno sviluppati e aggiornati secondo i più recenti mutamenti avvenuti nel mondo industrializzato, emergente e in via di sviluppo. In particolare i fenomeni demografici, migratori e di globalizzazione che influiscono fortemente su cambiamenti epidemiologici anche a carattere epidemico e pandemico, devono riorientare i percorsi formativi del personale chiamato a governare/gestire i sistemi/interventi sanitari.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione a livello nazionale e internazionale di capacità di governo/gestione di sistemi/servizi socio-sanitari adeguati al contesto in cui si collocano e operano, con particolare riguardo alle strategie regionali europee, con i Paesi emergenti e con i Paesi a minore crescita socio-economica. Definizione di percorsi di formazione in sanità pubblica rispondenti alle mutate esigenze globali, regionali e locali

Trasferibilità dei risultati

Identificazione, valutazione e validazione di percorsi formativi trasferibili ad altre realtà istituzionali di formazione sanitaria in particolare nei Paesi che intrattengono collaborazioni di scambio tecnologico-scientifico con l'ISS.

Master Universitario di primo e secondo livello Internazionale in Gestione dei Servizi Sanitari – in collaborazione con Università Carlo Cattaneo – Liuc e Gruppo Ospedaliero San Donato

Nel corso del 2005 è stata operata la riprogettazione del *curriculum* del *Master in Health Service Management* organizzato dall'ISS fin dal 1986, quando, su raccomandazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), 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 (Libero Istituto Universitario Carlo Cattaneo), internazionali (McGill *University* – Montreal Canada) e istituzioni sanitarie (Gruppo Ospedaliero San Donato), che consentirà il rilascio di un titolo di *dmaster* di I e II livello universitario.

Il rinnovato piano studi porterà all'erogazione di 60 crediti universitari ripartiti su vari moduli didattici.

L'iniziativa prevista con inizio nel 2006, 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 e all'accesso a tali mezzi che i partecipanti dimostreranno di avere;

Una fase di formazione mista (residenziale e a distanza), che sarà svolta a Castellanza (VA) presso il Libero Istituto Universitario Carlo Cattaneo e a Roma, presso l'ISS. Con lo scopo di permettere un'azione congiunta, efficace per valori e per costi, le strutture collaboranti

alterneranno momenti di aula e momenti di *e-learning* attraverso il sistema di videoconferenze e didattica *on-line* che l'ISS ha sviluppato e gestisce.

Una fase di ricerca applicata (*Field Project*), che costituisce parte integrante del percorso formativo del *Master*, che 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.

Portale per le emergenze sanitarie e formazione specifica

Il progetto, realizzato in convenzione con il Ministero della Salute, prevede la realizzazione di un portale comprendente modelli formativi e informativi, documentazione scientificamente validata, divulgabile a popolazione generale, professionisti sanitari di centri specializzati e della medicina territoriale relativamente alle possibilità di attacco terroristico.

Il progetto viene realizzato in collaborazione con l'IRCCS Spallanzani, che gestirà la componente di rischio infettivologico, mentre l'ISS realizzerà la componente di rischio fisico, chimico, nucleare.

Si prevede la collaborazione con enti nazionali e internazionali accreditati per garantire la divulgazione tempestiva e corretta di dati, elementi, modelli, e altri elementi cruciali, basati sull'evidenza scientificamente corretta anche dell'informazione generale.

Risultati attesi nel triennio

Strutturazione di un portale *web* completo, comprendente:

una sezione informativa per il pubblico generale

una sezione informativa specialistica per il personale sanitario

una sezione formativa di alta specializzazione per alcune categorie professionali

una sezione formativa generalistica per il personale della medicina e dell'assistenza sanitaria territoriale.

Trasferibilità dei risultati

Il personale e il pubblico generale verranno informati e formati con una base di dati e informazioni omogenea e consistente, periodicamente aggiornata e validata in collaborazione coi massimi esperti nazionali e internazionali del settore.

Prevenzione delle complicanze del diabete per i medici di famiglia e per i pediatri di libera scelta – corso sperimentale in modalità FAD

Gli individui adulti affetti da diabete presentano una mortalità annuale del 5.4% (un valore doppio rispetto a quello degli adulti non-diabetici), e la loro aspettativa di vita è ridotta in media di 5-10 anni. Sebbene l'aumentata mortalità appaia in gran parte dovuta alle malattie cardiovascolari, anche la mortalità associata a cause non-cardiovascolari è elevata. La diagnosi di diabete si associa con un incremento del rischio per diverse complicanze che sono in genere irreversibili e secondarie a danno micro e macrovascolare. La patologia diabetica colpisce circa il 3% della popolazione italiana, causa oltre 1.500.000 di ricoveri annui di circa 300.000 dovuti alle complicanze della malattia. La durata del diabete rappresenta un importante fattore nella patogenesi delle complicanze, ma altri fattori di rischio (ipertensione, fumo e ipercolesterolemia) interagiscono con il diabete nel determinarne l'evoluzione clinica.

La gestione appropriata del diabete e delle sue complicanze si basa per quanto riguarda i criteri organizzativi di servizio sull'armonizzazione degli interventi dei vari livelli su cui è organizzata l'assistenza sanitaria. Si tratta spesso di azioni consolidate dal punto di vista scientifico, che però vengono realizzate in maniera non del tutto coordinata, soprattutto tra i livelli specialistici del sistema sanitario e il livello di base, che riveste un'importanza cruciale nel *follow-up* terapeutico e riabilitativo e, soprattutto, nello *screening* clinico, nell'attuazione di protocolli diagnostico-terapeutici, nell'allineamento della raccomandazione specialistica con gli stili di vita e le semplici metodiche preventive disponibili. In modo particolare con il progetto qui presentato, ci si propone di creare una cultura "diabetica" nel personale sanitario di primo livello, per quanto attiene in maniera specifica:

L'adozione e l'implementazione di un protocollo condiviso al primo livello del servizio sanitario per quanto attiene: diagnosi, terapia, monitoraggio e richiami, valutazione laboratorio preceente l'insorgenza di problemi clinici conclamati.

Il consolidamento e la divulgazione ragionata delle evidenze disponibili e delle fonti di aggiornamento (terapia e terapia adiuvante)

La valorizzazione della strategia di promozione della salute e della diagnosi precoce (valutazione del rischio)

La valorizzazione della prevenzione secondaria (come comunicarla)

Il supporto familiare e sul lavoro (diabetics friendly home and working place)

Le fasi e le componenti critiche che sottendono allo sviluppo di questo corso si basano specialmente sulla consapevolezza della dirigenza e sul responsabile supporto di partecipanti adulti al buon esito di un progetto di formazione in modalità *e-learning*. La motivazione del personale sanitario è ugualmente cruciale per garantire il successo di un progetto basato su argomenti spesso controversi, per cui esiste scarsa evidenza assoluta in letteratura, al di là di un generale consenso sull'importanza di un rapporto corretto tra il mondo professionale sanitario e l'utenza effettiva o potenziale dei servizi sanitari stessi.

Risultati attesi nel triennio

Definizione delle modalità appropriate per implementare la prevenzione, il controllo e la cura della patologia diabetica e delle sue complicanze attraverso l'uso di buone prassi che abbiano evidenza scientifica di validità.

Individuazione delle modalità appropriate di comunicazione interpersonale e di comunicazione efficace per il miglioramento della relazione professionista sanitario – paziente – famiglia attraverso l'uso di buone prassi che abbiano evidenza scientifica di validità.

Individuazione delle misure di sanità pubblica in grado di ridurre la morbosità e la mortalità dovute alla patologia diabetica attraverso l'uso di buone prassi che abbiano evidenza scientifica di validità.

Individuazione dei sistemi di interconnessione e coordinamento delle reti sanitarie (medicina di base, emergenza sanitaria, specialistica ambulatoriale e ospedaliera) e sociali (tra settore sociosanitario e cittadini).

Produzione di un manuale contenente le corrette prassi identificate.

Produzione ed erogazione di un *curriculum* formativo in collaborazione con le società scientifiche che si occupano della patologia diabetica e delle sue complicanze.

Trasferibilità dei risultati

L'obiettivo generale del progetto è di garantire il miglioramento della capacità del sistema sanitario di prevenire le complicanze legate alla malattia diabetica, attraverso l'integrazione dei vari livelli di erogazione dei servizi e la partecipazione del paziente e della sua famiglia, anche attraverso il miglioramento della comunicazione tra i diversi settori. In tal senso il progetto formativo è ampio e si rivolge all'intero universo della medicina territoriale, costituita da circa 47mila Medici di Medicina Generale (previsione 2006) e da oltre 7mila Pediatri di libera scelta (previsione 2006). Attraverso il costante monitoraggio della qualità della formazione erogata e con l'interazione sistematica e attiva con i destinatari finali dell'attività sarà possibile garantire il positivo impatto del progetto e la trasferibilità delle conoscenze rese disponibili nella pratica clinica e organizzativa quotidiana. Il contatto con le associazioni di pazienti e con le società scientifiche specialistiche garantirà l'adozione delle buone prassi professionali basate sull'evidenza scientifica aggiornata.

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 quattro progetti di Ricerca Finalizzata (RF): due dal 2004, uno dal 2005 e uno, ancora dal 2005, cofinanziato e presentato da terzi, che vede l'URE coinvolto in qualità di Unità Operativa.

Il primo progetto, dal titolo "Integrazione dei servizi sanitari nel territorio Isola-to", è finalizzato a collocare i medici di medicina generale (MMG) operanti nei territori isolati al centro di una rete informatica di collegamento, da un lato, con strutture di alta specializzazione e, dall'altro, con i pazienti affetti da patologie cardiologiche o neurodegenerative gestibili a domicilio. L'implementazione del progetto prevede la dotazione dei MMG di una stazione elettronica con connessione in rete ad alta velocità, di strumenti di diagnostica cardiologica e di decodificatori per i segnali provenienti dai sensori da installare presso i domicili dei pazienti affetti da patologie neurodegenerative.

Il secondo progetto dal titolo "DiTAS (*Disease Management and Teleassistance Service*) - Teleassistenza per gestione del malato complesso non autosufficiente" si propone di valutare l'efficacia e i costi di un modello pilota di teleassistenza con interattività vocale automatizzata e

videotelefonia applicato a un campione di pazienti affetti da obesità grave non autosufficienti residenti in regioni isolate e/o montane o in aree metropolitane, semiurbane o rurali.

Il progetto "Isola-to", inizialmente sviluppato con riferimento ad alcune isole minori italiane, è stato ampliato nel 2005 attraverso il progetto dal titolo: "Continuità assistenziale. Arcipelago Salute" a ulteriori località e a ulteriori patologie. Fra queste: il diabete, le demenze e neuropsicosi, le patologie dermatologiche, della riabilitazione cardiopolmonare e dello *screening* oncologico.

Inoltre, essendo stato presentato dal Dipartimento Regionale Assistenza Ospedaliera della Regione Sicilia nel 2005 il progetto dal titolo "Rete telematica al servizio dei cittadini isol@ti" per estendere i benefici dei progetti già citati, legati ai territori isolati, l'URE prenderà attivamente parte allo sviluppo di quest'iniziativa come Unità Operativa.

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 del 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 del Servizio Sanitario Nazionale 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 il 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.

La struttura aperta e modulare delle reti, basate su IP e ISDN, le rende di particolare interesse per applicazioni di tipo clinico e didattico, oltre ad essere espandibile in modo modulare in ogni settore operativo. Analogamente sarà possibile fornire utili indicazioni sia sugli aspetti tecnologici ottimali per garantire la replicabilità dell'architettura di sistema, sia per quanto concerne il costo e i benefici in termini sanitari e organizzativi.

Per la diffusione dei risultati, si prevede di pubblicare periodicamente i risultati ottenuti. Attraverso il sito *web* dell'ISS sarà inoltre resa disponibile la documentazione di progetto e tutti i materiali correlati (proposte didattiche, manualistica e informazioni tecniche).

Progetto di Laboratorio Congiunto nel campo della formazione professionale in Salute Pubblica tra Istituto Superiore di Sanità 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 e in situazioni di emergenza complessa

La proposta è nata sulla base della collaborazione esistente tra Istituto Superiore di Sanità 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 verà 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 2 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.

Programma di supporto e assistenza tecnica al settore sanitario, West Bank and Gaza

Il progetto si propone di contribuire al miglioramento delle politiche di sviluppo e dei processi di pianificazione del Ministero della Sanità Palestinese con l'obiettivo di implementare misure di primo, secondo e terzo livello di assistenza e di prevenzione.

Il programma verrà realizzato in collaborazione con IRIS “*Conseil Santé*” (Francia) e “*Health Development Information and Policy*” (Palestina), i due *partner* che insieme all’ISS hanno presentato il progetto esecutivo approvato e finanziato dalla Commissione Europea. La strategia del progetto consiste nella promozione delle capacità e competenze locali, nel coinvolgimento a livello manageriale di esperti del settore sanitario e nello sviluppo di livelli ottimali di riferimento e gestione di pazienti affetti da patologie prevalenti nei territori palestinesi.

Risultati attesi nel triennio

Verranno elaborati piani di azione annuali sviluppati sulla base del Piano Sanitario Nazionale palestinese, con *budget* dettagliati comprensivi di analisi dei costi associati con le attività proposte. Verrà promosso lo sviluppo di un *budget* Sanitario Nazionale. Verrà elaborato e sperimentato un *business plan* pilota per rispondere ai problemi di Sanità Pubblica prioritari dei Territori, con particolare riferimento alla Striscia di Gaza, alla luce del recente ridispiegamento unilaterale israeliano. Saranno, infine, sviluppate strategie di prevenzione e contenimento del danno sanitario, clinico e organizzativo, determinato dalle frequenti situazioni di emergenza. In questo senso, sarà promossa la diffusione di una cultura amministrativa, di ricerca e analisi comunitaria e gestionale, al momento particolarmente debole nel contesto palestinese.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto contribuirà a:

- Migliorare le capacità del ministero di pianificare e realizzare scelte consapevoli in ambito sanitario in conformità a criteri oggettivi basati sull’evidenza di efficacia.
- Sviluppare piani d’azione annuali legati al piano sanitario strategico nazionale con *budget* che considerino l’analisi dei costi associati con le attività proposte
- Produrre un sistema trasparente di *budgeting* nazionale che nella sua implementazione rifletta le scelte di politica sanitaria intraprese.
- Sviluppare e implementare un piano d’azione pilota in grado di rispondere ai problemi di sanità pubblica identificati come prioritari, che si basi sull’uso integrato di cura e prevenzione primaria, secondaria e terziaria.
- Migliorare le abilità di tipo amministrativo e clinico del personale delle istituzioni sanitarie centrali, per favorire lo sviluppo e l’implementazione di scelte basate su modelli di costo-beneficio ed efficacia soprattutto legate alla gestione dei trasferimenti sanitari all’estero (pari al 30% del bilancio sanitario nazionale).
- Sviluppare strategie che permettano di gestire situazioni d’emergenza in relazione e ottemperanza a quanto stabilito dal Piano sanitario nazionale.
- Migliorare il sistema di coordinamento a livello degli enti centrali.
- Aumentare la capacità gestionale del settore pubblico, dando la priorità alla realizzazione e armonizzazione dei servizi nei confronti dei *provider* privati.

Programmi di gestione degli aspetti di sanità pubblica delle emergenze complesse e delle catastrofi naturali e delle manifestazioni epidemiche

L’ISS realizza progetti di emergenza per conto di varie entità: MAE, OMS, UNICEF e UNDP. Nel passato è stato il *partner* tecnico ed esecutivo delle agenzie internazionali impegnate nell’area balcanica durante l’intero periodo di belligeranza. Anche in aree di emergenza endemica, quali l’intero settore medio-orientale (in particolare la Palestina e l’Iraq), il Sudan, l’Etiopia, la Somalia e l’Eritrea, l’ISS ha realizzato e continua a realizzare progetti e interventi di assistenza tecnica, e di *capacity building*.

A seguito dell'emergenza tsunami in Sri Lanka, sono stati affidati all'ISS due progetti finanziati rispettivamente dal Dipartimento della Protezione Civile e dal MAE. Il primo è finalizzato all'identificazione del rischio a livello sia individuale che ambientale: a tal fine è stata disegnata un'indagine campionaria, con supporto alle strutture laboratoristiche responsabili delle analisi da effettuare sui campioni di cibo e acqua oltre che esami di *screening* clinico e valutazione delle capacità di assorbimento economico e sociale delle risorse impegnate dalla cooperazione internazionale nei processi di ricostruzione.

Il secondo prevede il potenziamento delle capacità formative nazionali nella gestione delle emergenze e nella preparazione alla gestione dei disastri e dell'impatto che ne consegue sui profili di salute della popolazione colpita

Risultati attesi nel triennio

In Sri Lanka, il supporto al *National Institute of Health Sciences*, controparte di entrambi i progetti nel Paese, rafforzerà il laboratorio di controllo di qualità degli alimenti e ne potenzierà le competenze formative a favore dell'intero sistema nazionale.

Il Progetto di valutazione della situazione sociosanitaria nei distretti di Kalutara, Galle, Matara e Trincomalee descriverà il rischio individuale e ambientale e le caratteristiche socio-sanitarie della popolazione dei distretti selezionati e validerà la morbosità riferita per patologie cronico-degenerative selezionate (diabete, ipertensione, malattie polmonari croniche). La diffusione dei risultati dell'indagine campionaria sarà effettuata tramite pubblicazioni scientifiche e la realizzazione di una conferenza nazionale.

Il Programma di *Capacity Building* per la gestione di disastri ed emergenze complesse in Sri Lanka formerà 75 operatori sanitari apicali, responsabili a loro volta della formazione di 660 formatori a livello di divisione (struttura intermedia nel sistema sanitario dello Sri Lanka) e produrrà materiale didattico nelle lingue locali cingalesi e tamil per poter successivamente formare oltre settemila operatori a livello periferico.

Trasferibilità dei risultati

La forte componente di *capacity building* e di potenziamento delle risorse umane garantirà da un lato una migliore rilevanza e appropriatezza degli interventi, dall'altra un'effettiva sostenibilità delle azioni tecnico-scientifiche impostate. Il potenziamento strutturale e di equipaggiamento verrà garantito attraverso l'utilizzazione di materiali disponibili localmente o sul mercato regionale. Per quanto riguarda le metodologie di ricerca e di diagnosi e programmazione, la formazione specifica professionale erogata a favore del personale pubblico che parteciperà alla realizzazione dei progetti garantirà l'acquisizione di conoscenze specifiche che potranno essere recepite nella conduzione di attività di controllo routinario al momento assenti.

Rafforzamento del sistema formativo della nuova amministrazione del Sudan meridionale a favore delle figure professionali infermieristiche e delle scienze sanitarie correlate e miglioramento della capacità di gestione dei servizi sanitari

Il progetto si propone di favorire la formazione di capacità manageriali, organizzative e di governo del personale sanitario del paese attraverso il supporto al Dipartimento delle Risorse Umane della nuova autorità sud-sudanese, in particolare attraverso la formazione dei quadri sanitari di livello intermedio e apicale.

Le attività previste consistono nella valutazione dei bisogni formativi delle categorie identificate, nello sviluppo di un *curriculum* che si prefigga, in base alle informazioni raccolte, di accrescere le capacità dei gestori sanitari per raggiungere gli obiettivi di una nuova politica sanitaria per il Sud Sudan, in particolare per quanto concerne il potenziamento delle capacità imprenditoriali e di leadership del sistema sanitario.

Il processo formativo si propone di migliorare le capacità di pianificazione e di gestione, più che particolari abilità tecniche, e la capacità di produrre analisi politiche e di sviluppo di medio e lungo termine, basate sull'efficacia dimostrata e su un approccio etico e sostenibile al governo sanitario da parte della nuova entità sudanese, assicurando appropriatezza e autonomia nella direzione di progetti finanziati dalla comunità internazionale.

Risultati attesi nel triennio

Disegno e implementazione di un percorso formativo per *manager* sanitari (medici, infermieri e amministrativi) in grado di coprire le carenze formative identificate nel campo dell'analisi dei dati qualitativi e quantitativi, nella gestione finanziaria e di *budget*; nello sviluppo di sistemi informativi (GIS e ICT); nelle capacità informatiche di base; nella valutazione di tecnologie; nelle comunicazioni e capacità di negoziazione basate sull'evidenza; nella pianificazione delle risorse umane nella gestione e pianificazione di corsi di formazione.

Trasferibilità dei risultati

I prodotti delle attività di progetto consentiranno al Dipartimento delle Risorse Umane del Ministero della Sanità del Sud Sudan di avvalersi di strumenti evoluti necessari per la gestione adeguata di servizi sanitari sottoposti a vincoli di natura politica, economica e professionale unici nel panorama dello sviluppo africano. La realizzazione di un percorso formativo originante dalla verifica dei bisogni di conoscenze e capacità dei partecipanti, facenti parte del sistema sanitario di un paese che non si avvale di un sistema di formazione continua, prevede l'impiego di una serie di attività propeeutiche e sperimentali destinate ad essere sviluppate ulteriormente nel prossimo futuro.

L'assistenza tecnica realizzata consentirà il trasferimento tecnologico di metodologie della formazione e delle "migliori pratiche" appartenenti alle eccellenze del SSN per contribuire alla realizzazione delle nuove norme gestionali in sviluppo in Sud Sudan.

Scuola di sanità pubblica virtuale e formazione a distanza accreditante

Il nuovo Regolamento di organizzazione (DPR 70/2001) ha trasformato l'Istituto in ente di diritto pubblico.

In qualità di organo tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale, l'ISS svolge funzioni di ricerca, sperimentazione, controllo, consulenza, documentazione e formazione in materia di salute pubblica. Relativamente a quest'ultimo, l'ISS "progetta, sviluppa e organizza attività di formazione e di aggiornamento in sanità pubblica per le esigenze del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), fornendo la proprie competenze tecniche e scientifiche. Sperimenta e sviluppa metodologie formative innovative, soprattutto nel campo della formazione a distanza, utilizzando una piattaforma *web* dedicata. L'offerta formativa dell'Istituto comprende sia moduli rivolti a operatori nazionali di sanità pubblica sia corsi più articolati rivolti a categorie professionali più ampie, a livello nazionale e internazionale. L'offerta formativa riguarda contenuti didattici, quali: *management* e valutazione dei servizi sanitari, epidemiologia e biostatistica, economia sanitaria, gestione delle risorse umane, metodologie di formazione dei formatori, promozione della salute".

Al fine di predisporre una risposta adeguata al nuovo compito istituzionale, il progetto prevede la realizzazione di una scuola di sanità pubblica virtuale, basata sull'uso intensivo di strumenti e tecnologie *web-based*, collegata a istituzioni di eccellenza, amministrazioni centrali e regionali, istituzioni internazionali, capace di erogare formazione certificata e accreditante a un consistente bacino potenziale, costituito dagli operatori del sistema sanitario nazionale, da giovani laureati nei profili professionali del sistema sanitario e da altri professionisti italiani e stranieri che rispondano ai requisiti di ingresso previsti. Il progetto si basa sul concetto della "scuola senza mura", realizzato attraverso l'uso della tecnologia più avanzata a supporto di

un'impostazione metodologica e docimologia innovativa e coerente con il compito e la visione formativa dell'ISS. Il progetto non prevede la costituzione di una scuola con sede fisica unitaria e con corpo docente costante e residenziale, a provenienza da un'unica istituzione, ma, viceversa, di una rete di erogatori istituzionali e individuali accreditati, sia universitari che di altra ragione sociale, che collaborano in modo flessibile e coordinato alla gestione e manutenzione di un progetto formativo unitario, di cui l'ISS, come centro promotore, costituisce il server paritetico, con caratteristiche funzionali precise e specifiche e con analogo livello gerarchico rispetto alle altre entità collegate. In questo modo, in assoluta coerenza con gli indirizzi espressi dal Ministero della Salute, utilizzando al meglio la tecnologia e le capacità tecniche e scientifiche del sistema sanitario e formativo nazionale, si concretizza la metafora di una scuola nazionale a copertura territoriale completa, ancorché virtuale. Le specificità regionali che conseguono al processo di devoluzione previsto dalla nuova legislazione italiana potranno, altresì, trovare un chiaro riscontro, con l'opportuna aggiunta di moduli regionali specialistici, comunque fruibili a scopo di documentazione o di *benchmarking*, da cui derivare e aggiornare le migliori prassi tecniche e gestionali da parte di tutti gli utenti della Scuola, secondo modalità di accesso già regolamentate e sperimentate dall'ISS, tali da garantire la sostenibilità anche economico-finanziaria della Scuola stessa.

La Scuola di sanità pubblica virtuale avrà una forte proiezione internazionale e i criteri guida che si intendono perseguire nella realizzazione delle attività formative nel prossimo triennio saranno improntati a un continuo processo di *benchmarking* e apprendimento organizzativo e tecnico su scala internazionale. In questo l'ISS possiede una già consolidata esperienza, con l'appartenenza al *Network* Internazionale delle scuole mediche che promuovono l'innovazione didattica, l'adesione all'Associazione delle Scuole di Sanità Pubblica europee (ASPHER) e i rapporti di collaborazione scientifica e tecnologica per la produzione di risorse umane qualificate in ambito scientifico e organizzativo-manageriale in ambito di sanità pubblica che da tempo legano l'ISS alle maggiori scuole statunitensi, canadesi e australiane. In aggiunta, la stabile collaborazione con la *National Library of Medicine* (NLM) degli Istituti di Sanità Nazionali americani, prevista dai recenti protocolli Italia-USA, consentirà di aumentare la qualità formativa del sistema, incorporando risorse digitali avanzate relative a documentazione bibliografica e a strumenti e tecnologie per la simulazione clinica e manageriale che saranno proposti all'interno del *curriculum* formativo dell'ISS, aumentandone così il potenziale didattico e la qualità dell'offerta.

Il progetto si inserisce nella strategia di accreditamento e certificazione a livello universitario e post-universitario della formazione dell'ISS, che ha portato alla collaborazione con istituzioni universitarie nazionali (LIUC Carlo Cattaneo, LUM Jean Monnet, università La Sapienza e Tor Vergata di Roma, Università di Catania) e internazionali (*McGill University*, Canada, *Harvard Medical School*, USA) per lo sviluppo di *curricula* formativi innovativi.

L'iniziativa si iscrive nelle linee di sviluppo strategico già promosse dall'ISS con il progetto speciale Scuola Nazionale di Salute Pubblica, sviluppato nel 2002 con risorse intramurarie e utilizzato per definire l'architettura e sperimentare i processi operativi che costituiscono l'ossatura metodologica e organizzativa dell'attuale attività di formazione in sanità pubblica dell'ISS.

Risultati attesi nel triennio

Costituzione di un centro di competenza che integri e completi l'offerta formativa italiana attraverso lo sviluppo, la produzione e l'erogazione di percorsi didattici *on demand* e in *outsourcing* per la formazione e l'addestramento *on-line*, *off-line* e *blended* in ambito medico-scientifico, coerentemente con, e nel rispetto delle procedure di accreditamento ECM nazionali e regionali e con le previsioni accademiche relative alla conduzione di corsi di laurea e di specializzazione di livello *master* (di primo e secondo livello). Tali percorsi saranno orientati a

fornire agli operatori sanitari strumenti di conoscenza e capacità aggiornati, oltre che elementi di cultura e di orientamento multi e intersettoriali, collegati al mondo professionale, che il corso tradizionale di studi non ha permesso di acquisire in modo coordinato e continuativo

Creazione di un *network* accessibile di istituzioni di eccellenza nazionali e internazionali

Sviluppo di soluzioni tecnologiche e multimediali innovative, che integrino la produzione, l'elaborazione, la gestione e la distribuzione della conoscenza in ambito di sanità pubblica

Sviluppo di contenuti formativi interattivi, basati su metodologie didattiche innovative

Trasferibilità dei risultati

Come già avvenuto per il progetto speciale Scuola Nazionale di Salute Pubblica citato, ogni risultato prodotto all'interno delle sperimentazioni metodologiche, formative e organizzative del progetto e il parallelo sviluppo di una rete di collegamenti formalizzati nazionali e internazionali con istituzioni di eccellenza collaboranti con la Scuola, saranno interamente applicabili e trasferibili all'ISS nel quadro della sua evoluzione strategica all'interno del mercato dell'offerta formativa accreditata ECM e accademica, anche in proiezione internazionale, in considerazione della presenza di competitori pubblici e privati di qualità variabile.

Sostegno ai Programmi di lotta all'AIDS nel Burundi, Rwanda e Uganda

Il progetto, di durata triennale, ha lo scopo di contribuire alla riduzione della prevalenza e della gravità dell'HIV/AIDS e di migliorare la qualità della vita di gruppi fragili di popolazione, individui e comunità colpite dall'epidemia di HIV/AIDS in Rwanda, Burundi e Uganda. Il progetto intende intervenire nel rispetto delle linee guida dei Piani operativi nazionali e delle direttive dell'UNAIDS-OMS e coerentemente con le linee guida definite dall'Assemblea Generale delle Nazioni Unite. A livello operativo, si intende sviluppare e valorizzare le capacità locali di ricerca applicata per il supporto scientifico agli interventi di lotta all'AIDS presenti e futuri, con particolare interesse agli studi epidemiologici, virologici e immunologici che rappresentano il presupposto e la condizione vincolante per ogni tipo di sperimentazione e controllo. In particolare, si struttureranno adeguatamente i laboratori e le infrastrutture sanitarie locali, formandone il personale, così da promuovere, tra l'altro, l'integrazione delle attività di progetto con quelle relative alla fase II e fase III di sperimentazione del vaccino contro l'HIV/AIDS sviluppato dall'ISS nel momento in cui ciò potrà avvenire, sulla base dell'evoluzione sperimentale in corso in Italia, dopo adeguata verifica dei comitati etici nazionali e dell'UNAIDS-OMS.

Risultati attesi nel triennio

Sistema di sorveglianza epidemiologica dell'HIV e delle altre MTS (malattie a trasmissione sessuale) migliorato

Strategie di controllo delle MTS elaborate

Laboratori di analisi in grado di svolgere correttamente i *test di screening* per l'HIV disponibili

N. di casi di infezione iatrogena fra il personale sanitario diminuito

Sistemi di prevenzione dell'infezione disponibili e correttamente utilizzati

Personale sanitario aggiornato

Sistema di coordinamento e collaborazione fra i tre Paesi sviluppato

Trattamento dei pazienti con AIDS e MTS adeguato

Accesso al trattamento delle malattie opportunistiche assicurato

Studi epidemiologici, economici e comportamentali tra la popolazione del distretto di Mbarara e nel nord Uganda condotti

Indagini di tipo clinico, epidemiologico e microbiologico nelle strutture sanitarie nelle strutture sanitarie afferenti all'Ospedale di Mbarara condotte.

Studi immunologici e virologici volti a valutare l'appropriatezza di particolari sottogruppi di popolazione per l'identificazione e caratterizzazione di coorti sperimentali eseguiti.

Protocolli per lo sviluppo di coorti sperimentali per ottenere stime dirette dell'incidenza da HIV e valori di riferimento preparati

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione delle attività del progetto contribuirà a:

ridurre la prevalenza dei gruppi vulnerabili nelle aree interessate dal progetto;

migliorare le condizioni socio-sanitarie della popolazione dei distretti coinvolti attraverso il miglioramento della qualità dei servizi sociosanitari offerti.

sviluppare e valorizzare le capacità locali di ricerca applicata, allo scopo di favorire l'identificazione e messa in atto di strategie e politiche efficaci e appropriate alla lotta all'AIDS nel contesto dei Paesi sede dell'intervento, anche allo scopo di identificare (in Uganda) coorti per eseguire studi economici, epidemiologici, immunologici e virologici propedeutici alla realizzazione di attività di contenimento dell'epidemia.

Sostegno al Ministero della Sanità del Sud Africa nello sviluppo della funzione di pianificazione strategica e coordinamento politiche sanitarie

Il progetto è finalizzato al miglioramento dello stato di salute della popolazione del SA, mediante il sostegno al processo di riforma sanitaria in corso nel Paese per una più efficiente, efficace ed equa distribuzione dell'assistenza sanitaria a favore della popolazione sudafricana, anche garantendo al *Department of Health* (DoH) nazionale (ministero della sanità) la disponibilità di adeguate informazioni indispensabili per una corretta pianificazione, gestione e valutazione dei servizi sanitari. L'obiettivo specifico del programma è orientato alla creazione e sviluppo della funzione di pianificazione strategica e di coordinamento delle politiche sanitarie a livello nazionale e del coordinamento con le analoghe funzioni a livello decentrato provinciale (equivalente al livello regionale italiano). Le attività presso il DoH, previste nel triennio di progetto, si concentreranno principalmente sullo sviluppo di un sistema informativo direzionale per utilizzi di tipo amministrativo, programmatico, gestionale, di valutazione dei servizi territoriali e ospedalieri; sulla realizzazione di un meccanismo di accreditamento e certificazione nazionale delle strutture sanitarie e sullo sviluppo delle risorse umane apicali coinvolte nei processi di riforma. Tali attività saranno svolte in collaborazione con istituzioni di eccellenza e amministrazioni regionali italiane, come la Regione Lombardia e la Regione Marche, con le quali sono stati stipulati specifici accordi di collaborazione tecnico-scientifica.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto produrrà effetti a due livelli: nazionale, attraverso il supporto alla produzione di documenti legislativi strategici (Piano strategico e Legge di Riordino) e di indirizzo politico per la produzione di *standard*, norme e regolamenti nelle aree tecniche della qualità; subnazionale (provinciale), attraverso l'opera di sviluppo delle capacità istituzionali e manageriali dei dirigenti sanitari apicali degli assessorati alla sanità provinciali, impegnati nell'opera di recepimento e adattamento alla realtà locale delle direttive centrali. Nello specifico, le attività di progetto porteranno:

allo sviluppo di un sistema informativo direzionale per una corretta pianificazione, gestione e valutazione dei servizi sanitari;

alla progettazione di un sistema per l'accreditamento dei servizi sanitari;

alla definizione e realizzazione prototipale di un sistema per l'Educazione Continua in Medicina

Trasferibilità dei risultati

I prodotti delle attività di progetto consentiranno al DoH nazionale l'utilizzo, all'interno del sistema sanitario sudafricano, di strumenti evoluti per la mappatura e la valutazione economica dei servizi erogati per singolo cittadino o gruppi di assistiti e la realizzazione di un sistema centrale di monitoraggio e di governo della domanda e dell'offerta delle prestazioni sanitarie erogate alla popolazione assistita. L'assistenza tecnica realizzata nelle aree dell'accreditamento e certificazione dei servizi sanitari, e dell'Educazione Continua in Medicina consentirà il trasferimento tecnologico delle migliori prassi prodotte dalle eccellenze del SSN e la realizzazione delle norme previste dalle leggi di riforma sudafricane.

Sostegno al Ministero della Sanità del Sudafrica per la realizzazione del programma nazionale di risposta globale all'HIV/AIDS nelle zone di confine tra Sud Africa e paesi circostanti e in regioni di sviluppo selezionate

Il progetto trae origine dall'intensa collaborazione istituzionale tra Dipartimento di Sanità Nazionale Sudafricano e ISS e è stato formulato a seguito di incontri e colloqui tecnici effettuati tra rappresentanti delle istituzioni dei due paesi ai massimi livelli (Ministri della Sanità, Presidenti e Direttori di istituzioni e enti di ricerca e sviluppo, Rappresentanti di fondazioni e altri enti specializzati). Il progetto mira alla riduzione e al controllo della diffusione dell'HIV/AIDS attraverso il trasferimento di conoscenze e tecnologie in campo vaccinale e allo sviluppo di competenze di *governance* nelle istituzioni sanitarie e di ricerca biomedica nazionali attraverso un processo di trasferimento di conoscenze, tecnologie e capacità a favore del sistema sanitario sudafricano e dei Paesi limitrofi, contestualmente alle previsioni dei rispettivi programmi nazionali di risposta globale all'HIV/AIDS (*HIV/AIDS National Response*). L'estrema complessità tecnico-scientifica e logistica del progetto comporta una fase di avvio, della durata di un anno, al fine di realizzare tutte le attività propedeutiche alle successive fasi di implementazione di seguito specificate: 1. Scelta dei siti clinici; 2. Scelta dei siti di laboratorio; 3. Attivazione della *Contract Research Organization* (CRO), come previsto dalle buone prassi di sperimentazione e conduzione di *trial* clinici; 4. *Capacity Building*; 5. Sviluppo di studi clinici epidemiologici, virologici, immunologici, ematochimici; 6. Attivazione della rete degli *stakeholders*; 7. Attivazione della produzione del vaccino; 8. conduzione e valutazione del *trial*.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto prevede di conseguire i seguenti risultati: 1. realizzazione della sperimentazione clinica di fase 2 e 3 con il vaccino Tat sviluppato dall'ISS nelle aree geografiche identificate; 2. potenziamento di tutte le strutture di laboratorio necessarie alla gestione diagnostica e terapeutica secondo gli schemi e gli standard predisposti dai Paesi collaboranti e alla sperimentazione clinica del vaccino; 3. sviluppo delle capacità del personale coinvolto nelle fasi di preparazione e conduzione di *trial* clinici e sperimentazione dei vaccini (dalla gestione del laboratorio alla clinica); 4. sviluppo e/o potenziamento di una rete di siti clinici localizzati nelle aree di progetto sufficienti per garantire l'erogazione di assistenza sanitaria qualificata a favore dei residenti, dei lavoratori stagionali, degli immigrati e delle loro famiglie; 5. sviluppo delle risorse umane impegnate nella gestione delle problematiche tecniche, scientifiche, tecnologiche e operative (in ambito medico, laboratoristico e socio-economico) legate all'epidemia di HIV/AIDS.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo del vaccino preventivo e terapeutico rappresenta lo scopo finale verso cui sono impegnate le risorse nazionali e internazionali al fine di controllare la diffusione dell'infezione e trattare con terapie meno tossiche i soggetti infettati, che, ad oggi, possono essere curati solo con combinazioni di farmaci ad elevata tossicità. L'adesione al trattamento, gli effetti

collaterali, la resistenza sono tutti fattori che limitano le attuali potenzialità terapeutiche, oltre ai costi elevati della multiterapia e alla difficoltà logistico-organizzativa di distribuzione e consolidamento della rete di erogazione, spesso impraticabile nei Paesi in via di sviluppo.

I risultati del progetto negli ambiti della prevenzione e del trattamento dell'HIV, come del rafforzamento della capacità di governo e della formulazione di politiche sanitarie, sono completamente trasferibili ai paesi beneficiari e potranno essere applicati a realtà territoriali colpite dalle stesse problematiche sanitarie e organizzative.

Stili di vita salutare nei giovani

Il progetto, realizzato in convenzione con il Ministero della Salute, prevede la realizzazione di un modello integrato per la progettazione di interventi di informazione e sensibilizzazione per la messa a punto di campagne informative rivolte alla popolazione giovanile su tutto il territorio nazionale. Lo scopo finale del progetto consiste nel contribuire al consolidamento di una corretta cultura della salute nel Paese.

Più specificatamente, gli obiettivi del progetto comprendono, da un lato, un'analisi sociodemografica e di costume dei *target* a cui saranno rivolte le campagne di comunicazione che il Ministero realizzerà in avvenire e, dall'altro, una componente formativa volta a sostenere, attraverso un modello condiviso, la capacità di progettazione e attuazione di interventi di informazione e sensibilizzazione dei cittadini relativamente all'adozione di stili di vita salutari.

Tale componente si avvarrà di processi e metodi di formazione appropriati al *target* di professionisti individuato dal progetto e ai riferimenti tecnico-scientifici dettati dalla teoria andragogica sulla formazione degli adulti. I processi formativi saranno gestiti secondo un sistema di gestione di qualità rispettoso della norma UNI EN ISO 9001:2000 e associato al processo di Miglioramento Continuo della Qualità.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione delle abilità e competenze formative tra i professionisti della promozione della salute per progettare, organizzare e valutare campagne informative sugli stili di vita della popolazione giovanile su tutto il territorio nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di percorsi di formazione per mettere in grado i professionisti della salute pubblica di progettare, erogare e valutare efficaci campagne volte a introdurre stili di vita salutari.

Supporto allo sviluppo organizzativo del Sistema Sanitario Distrettuale e dell'Assistenza Sanitaria di Base in Yemen

Il progetto si propone di migliorare lo stato di salute della popolazione delle aree interessate attraverso lo sviluppo delle capacità gestionali dei funzionari del locale Ministero della Sanità (MoPHP) e il sostegno al sistema informativo sanitario al fine di garantire la formulazione di politiche e prassi sanitarie basate sull'evidenza e un più attivo coinvolgimento delle comunità e delle autorità locali nella programmazione dei servizi sanitari.

In particolare, il progetto prevede di contribuire al miglioramento del sistema di assistenza sanitaria di base a livello distrettuale, favorendo la creazione di flussi di riferimento tra *input* nazionali e provinciali ed esigenze delle comunità locali.

Risultati attesi nel triennio

Formatori nazionali formati e assistiti nei seguenti processi:

- Revisione della metodologia e aggiornamento dei contenuti dei moduli formativi sviluppati nel corso del Diploma in gestione dei servizi sanitari dal centro di formazione manageriale di Sanità (MHTC)
- Revisione con metodologia basata sull'utilizzazione di problemi (PBL) del corso di Diploma
- Definizione degli Obiettivi Generali e Specifici dei moduli didattici offerti
- Costruzione dei problemi e identificazione del materiale didattico
- Definizione e realizzazione di sistemi di valutazione.

Trasferibilità dei risultati

La formazione dei formatori prevede la formazione di capacità *in loco* e lo sviluppo di una metodologia di formazione in grado di concentrare l'attenzione sui partecipanti, sulle carenze formative da questi individuati, sull'implementazione delle capacità di ricerca di materiali e contenuti da parte degli studenti, sullo sviluppo di sistemi trasparenti e condivisi di valutazione formativa e certificativa dei partecipanti. L'implementazione di *curricula* con tali caratteristiche si prefigge di formare in modo attivo il personale sanitario partecipante, favorendo la creazione di un modello pilota di formazione continua in un paese ancora privo di legislazione al riguardo, in grado di supportare un'azione di pianificazione e di gestione decentrata a livello distrettuale.

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

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma
Roma, luglio 2006*