

3.1.6 Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso

Il progetto ha avuto inizio a partire dalla metà dell'anno 1996 con il finanziamento, mediante convenzioni, di dodici specifici progetti di ricerca scelti tra quelli presentati a seguito di bando nazionale. Nel febbraio 1997 si è svolto, presso l'ISS, il primo Convegno nazionale delle unità operative impegnate nelle specifiche ricerche; oltre alla esposizione dei primi risultati ottenuti, l'incontro ha avuto anche lo scopo di valutare possibili interazioni tra le varie unità operative per un approccio multidisciplinare a quelle ricerche che hanno evidenziato i risultati più interessanti. Alcune collaborazioni sono così emerse nelle proposte di ricerca presentate nel luglio 1997 a seguito del nuovo bando relativo al "Secondo progetto" che prevede di finanziare, entro il 1997, quindici proposte (su 27 pervenute). La formulazione dei giudizi di priorità per il finanziamento del secondo progetto, oltre alla prosecuzione dei lavori relativi alla ricerca in corso, ha permesso anche l'inserimento di alcune nuove unità operative.

Vengono riportati in maniera concisa i risultati emersi nel primo anno di attività, suddivisi per sottoprogetto.

Aspetti chimico-fisici e profili analitici connessi alla qualità di farmaci per uso umano e veterinario

Farmaci chirali. - In questa linea di ricerca, finalizzata ad evidenziare dati scientifici idonei per promuovere il "passaggio" dall'uso di farmaci in forma racemica al singolo enantiomero o da miscele diastereoisomeriche al singolo diastereoisomero, è stata data la precedenza a quei farmaci presenti sul mercato da diversi anni in forma racemica

e per i quali potrebbe non esistere un particolare interesse a migliorare la qualità da parte delle industrie produttrici.

Nell'ambito di derivati diidropiridinici (nitrendipina, manidipina) e di farmaci attivi sui recettori alfa-adrenergici (midodrina) sono emersi risultati che, per la prima volta, evidenziano l'inattività, ovvero la non efficacia, di un enantiomero rispetto all'altro.

E' stata anche messa a punto una "banca dati" specialistica e aggiornata per poter individuare classi di farmaci chirali da sottoporre ad ulteriori studi, sia per quanto riguarda l'aspetto analitico che quello farmacologico e/o clinico sulla base di criteri oggettivi, peraltro non ancora perfettamente definiti.

Fotostabilità e fotoreattività. - Per diverse classi di farmaci largamente usati è nota la loro fotostabilità *in vitro* e *in vivo* e il loro effetto fototossico; mancano però indicazioni sufficienti sui meccanismi molecolari la cui conoscenza è la premessa per la progettazione di sistemi in grado di rallentare o bloccare sia i processi di fotodegradazione che quelli di fotosensibilizzazione. Sono stati così intrapresi studi su alcuni farmaci (come fluorochinaloni, nifedipina, clorpromazina, antiinfiammatori, nicardipina, labetalolo) con obiettivi specifici come: a) chiarire il processo di degradazione sotto irraggiamento (in particolare con UVA e UVB), individuare i prodotti formati; chiarire i meccanismi operanti sia in assenza che in presenza di biosubstrati quali membrane cellulari o DNA; b) rilevare e quantificare il danno ossidativo prodotto su membrane biologiche isolate e su membrane di cellule attivamente metabolizzanti.

Proprietà di stato solido. - Alcune proprietà dello stato solido, come il polimor-

fismo e lo pseudopolimorfismo (un esempio di quest'ultimo è la trasformazione di un composto anidro in idrato e viceversa), conferiscono alle materie prime di interesse farmaceutico e conseguentemente ai prodotti finiti, diverse proprietà fisico-chimiche (densità, solubilità, velocità di dissoluzione, stabilità) e farmaco-tecnologiche (sospensibilità, reologia, comportamento nei processi di mescolamento, polverizzazione e compressione). Tali proprietà influenzano lo sviluppo di un medicinale *per os* potendo rivelarsi parametri di formulazione critica ai fini dell'efficacia e della sicurezza del prodotto; esse costituiscono pertanto punti critici delle forme farmaceutiche per via orale.

Le ricerche effettuate e rivolte al complesso sulfadimidina-trimethoprim, alla picotamide anidra e monoidrata e ad alcune ciclodestrine e maltodestrine hanno evidenziato, per tali farmaci, chiare differenze di comportamento delle loro diverse forme polimorfe o pseudopolimorfe.

Processi di sterilizzazione e loro influenza sulle proprietà del principio attivo. - Il trattamento di materie prime e di forme farmaceutiche finite con radiazioni ionizzanti può essere utilizzato per l'abbattimento della carica microbica purché tale trattamento non induca alterazioni strutturali o fenomeni di decomposizione nel materiale esposto. La conoscenza degli eventuali processi indotti da tale trattamento è pertanto importante per le autorità di controllo dei farmaci, anche alla luce del fatto che l'irraggiamento può essere effettuato e non dichiarato su prodotti rivelatisi difettosi nei confronti della loro carica batterica.

Oltre alla messa a punto di procedure utili (risonanza paramagnetica elettronica) per verificare se un dato substrato è stato sottoposto ad irraggiamento gamma o elet-

tronico, lo studio intrapreso è stato rivolto a sistemi terapeutici microparticellari a rilascio modificato; in particolare sono stati studiati gli effetti indotti da irraggiamento gamma su microsfele di copolimeri polilattidici-co-glicolidi contenenti bupivacaina.

Farmaci e loro metaboliti in campioni biologici

Fattore di variabilità in farmacocinetica. - L'uso sicuro dei farmaci nella popolazione anziana rappresenta uno dei problemi di maggiore complessità per il medico pratico. Infatti le attuali conoscenze riguardanti la farmacocinetica e il metabolismo dei farmaci nel soggetto anziano risultano carenti e l'approccio terapeutico è difficile per le caratteristiche estremamente variabili della terza età.

In questo contesto sono stati intrapresi due studi relativi a: 1) l'uso di modelli matematici derivati da indagini con soggetti giovani e convalidati su anziani per prevedere il comportamento farmacocinetico, in anziani, dei farmaci più importanti; 2) la caratterizzazione dei fattori che possono modificare il profilo cinetico-metabolico (con particolare riferimento al ruolo dell'età) dei farmaci chirali.

Per quanto riguarda il primo argomento sono stati esplorati e messi a punto alcuni modelli matematici per la previsione del comportamento cinetico, in soggetti anziani, della digossina e tobramicina.

Il farmaco chirale sul quale è stata focalizzata l'attenzione in relazione al secondo argomento è la fluoxetina, uno degli psicofarmaci più frequentemente prescritti; l'obiettivo di questo studio è anche quello di valutare la correlazione tra livelli plasmatici degli enantiomeri in esame e la loro risposta clinica.

3.1.7 Terapia genica: ricerca di base, aspetti bioetici e proiezioni cliniche

Le unità operative afferenti al progetto "Terapia genica" hanno condotto ricerche di base pre-cliniche e cliniche in tre settori chiave: la terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche [con proiezione terapeutica in malattie emato-immunologiche ereditarie (ad es. β -talassemia) o acquisite (ad es. AIDS) e nelle leucemie], dei tumori solidi (utilizzo di vaccini antitumorali) e delle malattie cardiovascolari (terapia genica della ristenosi arteriosa, in particolare coronarica). A livello internazionale, queste aree di ricerca hanno una elevatissima priorità biomedica: di conseguenza, ad esse viene attribuita una quota ingente delle risorse scientifiche e finanziarie.

Il consuntivo scientifico del progetto è assai incoraggiante. Tra i diversi risultati, sono da segnalare due aspetti di particolare rilievo.

a) E' stato messo a punto un sistema innovativo di trasduzione genica retrovirale potenzialmente in grado di superare molte delle limitazioni insite nei sistemi di "gene delivery" sinora disponibili.

Utilizzando questo sistema, è stato possibile inserire in cellule progenitrici ematopoietiche normali un gene di fusione (PML-RAR α o AML-1-ETO) associato, rispettivamente, alla leucemia acuta promielocitica o mielomonocitica. Le cellule trasdotte hanno acquisito il fenotipo di cellule leucemiche promielocitiche o mielomonocitiche: è stato in tal modo ottenuto, per la prima volta, un modello di leucemogenesi umana *in vitro*. Questo approccio sperimentale assume una valenza a carattere generale: infatti, fornisce una metodologia per l'identificazione di geni leucemogeni e per lo studio dei relativi meccanismi oncogenetici; inol-

tre, rappresenta un modello innovativo per studi *in vitro* sulla terapia delle leucemie, in particolare la terapia genica. Sarà inoltre possibile estendere tale approccio ai tumori solidi, tentando di ottenere modelli di oncogenesi *in vitro* mediante trasduzione di oncogeni in cellule umane normali.

D'altra parte, questo sistema di trasduzione genica retrovirale potrà essere di prezioso ausilio nella terapia genica di cellule staminali in numerose malattie emato-immunologiche ereditarie (ad es. β -talassemia, immunodeficienza combinata di tipo SCID) o acquisite (ad es. AIDS).

b) La malattia coronarica, uno dei maggiori capitoli di spesa nella sanità dei paesi occidentali, viene spesso trattata con angioplastica percutanea transluminale (PTCA): i benefici di tale procedura sono tuttavia limitati, poiché in ~30-50% dei pazienti si assiste ad una ristenosi del segmento di vaso dilatato.

La ristenosi è causata da una proliferazione delle cellule muscolari lisce arteriose, mediata da una complessa catena di fenomeni: due anelli della catena sono l'attivazione del proto-oncogene *ras* e della proteinkinasi A cAMP-dipendente (PKA). E' stato dimostrato che, in modelli sperimentali, l'inibizione di *ras* [mediante trasduzione genica di dominanti negativi (dn) di *ras*] o di PKA (mediante terapia farmacologica locale) blocca la proliferazione delle cellule muscolari arteriose: risultati particolarmente incoraggianti sono stati ottenuti dopo terapia genica con *ras* dn.

In futuro, è realistico prospettare l'uso di "stent" ingegnerizzati con resine a rilascio lento, che contengono cDNA di *ras* dn (o forse attivatori di PKA, come il cAMP): in effetti lo stent "stainless steel" può essere ricoperto con uno strato di imina polietilenica e destran solfato per rilasciare local-

mente *ras* dn (o, in alternativa secondaria, cAMP). Si propone che la prossima fase di ricerca sia uno studio clinico che valuti la fattibilità di quest'approccio terapeutico per la cura della ristenosi dopo angioplastica.

Il progetto "Terapia genica", supportato dai fondi 1% (art. 12, DLvo 502/1992) per gli anni finanziari 1993-1996, è attualmente in pieno svolgimento. Ad esso afferiscono 11 unità operative extra- e intra-murali, articolate in due sottoprogetti: 1) Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche; 2) Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari.

I due sottoprogetti sono così suddivisi:

1) *Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche:*

- Trasferimento genico nelle cellule staminali ematopoietiche umane.

- Fattori trascrizionali nell'ematopoiesi umana normale e neoplastica: nuove strategie per la terapia genica delle cellule staminali/progenitrici.

2) *Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari:*

- Caratterizzazione e ottimizzazione funzionale di un elemento IRES di un trascritto bicistronico umano: potenziale utilizzo nella terapia genica retrovirale.

- Terapia genica nei tumori umani: vaccinazione con cellule antigeniche geneticamente modificate e potenziamento da proteine di fusione anticorpo-interleuchina 2.

- Basi sperimentali per vaccini antitumorali geneticamente modificati.

- Vaccini umani tumorali geneticamente modificati esprimenti IFN- α , associato o meno a timidinchinasi di virus *Herpes simplex*.

- Terapia genica nel trattamento della ristenosi dopo angioplastica coronarica percutanea.

- Terapia genica della ristenosi: trasferimento genico in loco della Apo A-Imilano in un modello di danno vascolare nel coniglio.

- Terapia genica diretta intramuscolare nelle malattie cardiovascolari.

Consuntivo scientifico e prospettive di sviluppo

Le unità operative hanno condotto ricerche di base a proiezione clinica, o ricerche pre-cliniche e cliniche in tre settori chiave: la terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche (con proiezione terapeutica in malattie ereditarie o acquisite emato-immunologiche), dei tumori solidi (utilizzo di vaccini antitumorali) e delle malattie cardiovascolari (terapia genica della ristenosi arteriosa, in particolare coronarica).

A livello internazionale, queste aree di ricerca dimostrano uno sviluppo esponenziale: in effetti, ad esse viene attribuita una elevatissima priorità biomedica, e di conseguenza una quota ingente delle risorse scientifiche e finanziarie.

I risultati finora ottenuti dal progetto "Terapia genica" sono quanto mai incoraggianti, in linea con il quadro generale di progresso internazionale.

Vengono presentati in dettaglio due studi di particolare rilievo scientifico (paragrafi a e b), che sono oggetto di pubblicazioni in riviste di eccellenza internazionale; gli altri risultati ottenuti vengono esposti sinteticamente nel paragrafo c.

a) La terapia genica di malattie emato-immunologiche ereditarie (ad es. β -talassemia, immunodeficienza ereditaria combinata di tipo SCID) o acquisite (ad es. AIDS) mira alla trasduzione di geni terapeutici nelle cellule staminali ematopoietiche (ad es. trasduzione del gene ADA nella immu-

nodeficienza SCID). Questo obiettivo è reso difficoltoso dalla estrema rarità delle cellule staminali e dalla relativa inefficienza della trasduzione genica ottenuta mediante le metodologie sinora disponibili. Su questi due aspetti il progetto (ricerche sul trasferimento genico nelle cellule staminali emopoietiche umane) ha conseguito progressi rilevanti, sia attraverso lo sviluppo della tecnologia di purificazione delle cellule progenitrici/staminali ematopoietiche, ma soprattutto con la messa a punto di sistemi innovativi di trasduzione genica, in collaborazione tra l'ISS, l'Istituto Oncologico Europeo, Milano e la Stanford University, S. Francisco, USA.

Caratteristiche tecnologiche del sistema retrovirale di trasduzione genica. - Questo sistema ha una serie di caratteristiche innovative: 1) è basato su vettori retrovirali chimerici (contenenti il sito di replicazione e il gene EBNA-1 di EBV, al fine di mantenere episomale il plasmide retrovirale MFG), nei quali è stato inserito sia il gene "reporter" ("green fluorescence protein", GFP) sia il gene esogeno da trasdurre; 2) il livello di produzione delle particelle retrovirali è elevato (il titolo virale è superiore di ≥ 1 log rispetto ai sistemi tradizionali); la linea cellulare produttrice ("Phoenix", costituita di fibroblasti di rene di scimmia) viene allestita in tempi assai brevi, mediante transfezione transiente; 3) la trasduzione genica delle cellule progenitrici/staminali è elevata (l'efficienza di trasduzione è pari a ~40-50%); 4) le cellule trasdotte possono essere sorte in base all'espressione della GFP, in modo da ottenere una popolazione cellulare contenente il 100% di cellule esprimenti la GFP e il gene esogeno; infine 5) il numero di copie di vettore retrovirale integrato varia da 1 a 4 (aspetto metodo-

logico del tutto innovativo) e il livello di espressione del gene GFP e del gene esogeno sono direttamente correlati: si possono quindi separare popolazioni di cellule progenitrici/staminali con espressione modesta o elevata dei geni trasdotti (in quanto contenenti una o più copie del vettore retrovirale), con un effetto di "dosaggio genico" (aspetto anch'esso del tutto innovativo).

Questo sistema di trasduzione genica è potenzialmente applicabile ad uno spettro assai vasto di patologie cliniche emato-immunologiche, come detto, con prospettive del massimo interesse scientifico-biomedico.

Utilizzando tale sistema, è stato possibile inserire in cellule progenitrici/staminali normali il gene codificante la proteina di fusione PMLRAR α , associata alla leucemia acuta promielocitica. Le cellule trasdotte hanno acquisito il fenotipo di cellule leucemiche promielocitiche (stimolo proliferativo, blocco differenziativo a livello promielocitico e inibizione dell'apoptosi) in tutte le condizioni di coltura utilizzate (in particolare, in assenza o in presenza di fattori di crescita ematopoietici). È stato in tal modo ottenuto, per la prima volta, un modello di leucemogenesi umana *in vitro*: questo modello ha potenzialmente un'importanza fondamentale nello studio delle patogenesi e della terapia di questa forma leucemica.

Risultati analoghi sono stati ottenuti trasducendo il gene della proteina di fusione AML-1-ETO, associata a talune leucemie acute mielomonocitiche: in tal caso le cellule progenitrici/staminali trasdotte venivano indotte a proliferazione e differenziazione monocitica, associata a inibizione dell'apoptosi e caratteristiche morfologiche evidenti di atipia leucemica.

Questo approccio sperimentale assume quindi una valenza a carattere generale, e si configura come una nuova metodologia per l'identificazione di geni leucemogenetici e per lo studio dei relativi meccanismi oncogenetici, oltre che come modello innovativo per studi *in vitro* sulla terapia delle leucemie, in particolare sulla terapia genica. Inoltre, questi vettori retrovirali di nuova generazione potranno essere applicati vantaggiosamente alla terapia genica di cellule staminali purificate in numerose malattie emato-immunologiche, ereditarie (ad es. β -talassemia, immunodeficienza combinata di tipo SCID) o acquisite (ad es. AIDS).

b) La malattia coronarica rappresenta uno dei maggiori capitoli di spesa nella sanità dei paesi occidentali. Una delle terapie selettive per la malattia coronarica è rappresentata dall'angioplastica percutanea transluminale (PTCA): circa un milione di PTCA vengono eseguite ogni anno. D'altra parte, i benefici di tale procedura sono limitati, poiché in ~30-50% dei pazienti si assiste ad una ristenosi del segmento di vaso dilatato. Non vi sono trattamenti efficaci della ristenosi (riduzione della formazione della neointima dopo danno endoteliale, osservata a livello sperimentale e confermata nei "trial" clinici). Con la possibile eccezione dell'eparina, non sono ancora disponibili agenti terapeutici in grado di inibire la proliferazione delle cellule muscolari da mitogeni (ad es. da PDGF ed EGF). L'interazione di vari fattori coinvolti nella crescita con i loro recettori induce una serie complessa di reazioni biochimiche, che attivano il protooncogene *ras* o la proteinchinasi A cAMP-dipendente (PKA): di conseguenza, l'approccio utilizzato nelle ricerche sulla terapia genica nel trattamento della ristenosi dopo angioplastica coro-

narica percutanea ha mirato ad inibire le proteine *ras* o PKA con due tipi diversi di molecole: 1) plasmidi esprimanti cDNA dominanti-negativi (dn) di *ras* e 2) agenti farmacologici che incrementano i livelli di cAMP in modo da mantenere elevata l'attività di PKA. E' stato dimostrato che questi due approcci sperimentali consentono di bloccare sperimentalmente la proliferazione delle cellule muscolari arteriose *in vivo*: risultati particolarmente incoraggianti sono stati ottenuti dopo terapia genica con *ras* dn.

E' di conseguenza realistico immaginare che, nell'immediato futuro, si possa far uso di "stent" ingegnerizzati con resine a rilascio lento che contengono cDNA di *ras* dn (o attivatori di PKA come il cAMP), in modo simile a come si sta sperimentando oggi con "stent" ricoperti con poliaminaeparina: in effetti lo "stent" "stainless steel" può essere ricoperto con uno strato di imina polietilenica e destran solfato per rilasciare localmente *ras* dn (o, in alternativa secondaria, cAMP). Si propone che la prossima tappa sperimentale sia uno studio clinico che validi la fattibilità di quest'approccio terapeutico per la cura della ristenosi dopo angioplastica.

c) Le altre linee di ricerca afferenti al sottoprogetto 1 ("Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche") hanno prodotto risultati di rilievo. In particolare, l'Istituto "S. Raffaele" di Milano ha sviluppato sistemi di trasduzione genica con caratteristiche linea-specifiche, di notevole interesse per la terapia genica di malattie ematologiche ereditarie di una singola linea ematopoietica (ad es. la β -talassemia e altre malattie ereditarie eritropoietiche). L'ISS, in collaborazione con il Dipartimento Biopatologia umana dell'Università "La Sa-

pienza" di Roma e il Dipartimento di Scienze biomediche ed oncologia umana dell'Università di Torino, ha caratterizzato una larga casistica di leucemie acute mieloidi e linfoide, per quanto attiene l'espressione sia di recettori di fattori di crescita (ad es. IL-3) sia di fattori di trascrizione (ad es., GATA-1 e TAL-1), che svolgono una funzione chiave sulla regolazione della proliferazione-differenziazione ematopoietica normale. I risultati hanno una notevole importanza per valutare l'eventuale funzione di questi recettori e fattori trascrizionali nella leucemogenesi, e aprire quindi la possibilità ad approcci terapeutici molecolari al livello dei blasti leucemici. In parallelo, è stato dimostrato che la trasduzione del gene TNF- α o IL-2 in cellule di T linfoma linfoblastico induce rispettivamente apoptosi, associata ad un effetto "killing" sulle cellule viciniori e riconoscimento specifico delle cellule tumorali, associato ad espressione del recettore CD3.

Oltre ai risultati sulla ristenosi arteriosa sopracitati, il sottoprogetto 2 ("Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari") ha condotto ricerche di sicuro interesse.

Nel settore di ricerca di base, è stata identificata e caratterizzata funzionalmente una sequenza IRES umana nel "cluster" D dei geni homeobox, potenzialmente in grado di ottimizzare la traduzione combinata di due geni nella cellula "target".

Nel settore di terapia genica nei tumori solidi, le ricerche dell'Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori di Milano hanno dimostrato sperimentalmente l'efficacia terapeutica di vaccini anti-

tumoralmente ottenuti mediante trasduzione genica di IL-12, comparativamente a IL-2 o IL-4; a livello clinico, linee di melanoma trasdotte con i geni per IL-2 e/o B7.1 hanno dimostrato un'aumentata immunogenicità e sono quindi di potenziale utilizzo clinico in pazienti affetti da melanoma. Nell'ambito delle ricerche, condotte presso l'Università di Torino, sulle basi sperimentali per vaccini antitumorali geneticamente modificati, è stata svolta una serie di indagini sull'effetto antitumorale *in vivo* di numerose citochine (iniettate come tali e/o trasducendo i geni relativi in cellule neoplastiche), in particolare IL-12 e IL-2, ma anche IL-4, -6, -7, -10, GM-CSF, IFN- α e - γ , TNF- α , valutando comparativamente l'efficacia antitumorale dei diversi approcci bioterapici. La ricerca condotta in Istituto nell'ambito dei vaccini umani tumorali geneticamente modificati esprimenti IFN- α ha brillantemente documentato la possibilità di cura radicale di topi trattati con cellule eritroleucemiche di Friend trasdotte con i geni per IFN- α 1 e timidinchinasi di virus *Herpes simplex* dopo trattamento con ganciclovir.

Nel settore cardiologico la ricerca sulla terapia genica della ristenosi, condotta dall'Istituto di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano, ha dimostrato: 1) l'inibizione dell'ispessimento dell'intima dopo manipolazione perivascolare mediante trasduzione del gene dell'apolipoproteina A-1 (MILANO, 2) la parziale correzione dell'iperlipoproteinemia nel topo "knock-out" per apolipoproteina E (apoE) dopo trattamento con plasmidi contenenti il gene apoE4 diretto da promotori virali.

3.1.8 Sviluppo dell'uso di protoni in terapia oncologica

Nel 1995 è stato costituito il Comitato scientifico di progetto e sono state analizzate le varie opzioni possibili sul tipo di macchina acceleratrice da impiegare. Queste possono essere raggruppate in tre classi: a) ciclotroni isocroni superconduttori, ad alto campo magnetico; b) sincrotroni non superconduttori pulsati, ad alto campo magnetico; c) acceleratori lineari per protoni ad alto gradiente.

Dai primi studi effettuati è apparso, inoltre, importante scegliere di "iniettare" nell'acceleratore principale protoni già portati ad un'energia relativamente elevata, in modo da permettere anche la produzione di isotopi radioattivi utili per la PET (positron emission tomography), che diverrebbe una importantissima ulteriore metodica (diagnostica) a disposizione.

La definizione del tipo di macchina acceleratrice ha costituito il momento cruciale dell'intero progetto, poiché ha permesso di effettuare le scelte tecnologiche più opportune e di progettare l'acceleratore in modo da ottenere il massimo grado di affidabilità.

Dopo sei mesi di studi e diverse riunioni del Comitato scientifico di progetto, è stata esclusa l'opzione sincrotrone, focalizzando l'attenzione su due macchine, l'acceleratore lineare e il ciclotrone superconduttivo.

Successivamente alla decisione finale del Comitato scientifico di progetto che, nel corso del 1995, aveva selezionato il progetto di acceleratore lineare (TOP Linac), ci si è attivati, in collaborazione con l'ENEA, per definire in modo più preciso i parametri della macchina in funzione delle varie utenze, quali la protonterapia, la produzione di radioisotopi per PET e gli esperimenti di radiobiologia e dosimetria.

Per quanto riguarda la protonterapia, che è l'applicazione principale del TOP linac, sono stati effettuati studi per comprendere l'incidenza di alcuni parametri della macchina sulle caratteristiche dell'irraggiamento, elencando le principali specifiche cliniche e, conseguentemente, fisiche che un fascio di protoni dedicato alla protonterapia deve soddisfare per essere efficacemente usato nella maggior parte delle patologie.

Si è deciso di progettare il TOP Linac con tre uscite di fascio. La prima (Beam-1) con fascio a 65 MeV, adatto unicamente per la terapia dell'occhio, la seconda (Beam-2) con fascio ad energia variabile tra 65 e 200 MeV ma a posizione fissa con direzione orizzontale, e la terza (Beam-3) con fascio ad energia variabile tra 65 e 200 MeV, distribuito da una testata isocentrica rotante.

La Tabella 13 riassume le specifiche di protonterapia, così come offerti dal TOP Linac sulla base del lavoro svolto negli ultimi tre anni.

Per integrare il sistema di produzione di radioisotopi per la diagnostica PET nel TOP Linac si è individuato un iniettore (Linac iniziale che costituirà la prima parte del TOP Linac) in grado di generare un fascio di 7 MeV in due modalità di funzionamento, a bassa (10 nA) o ad alta (20 μ A) corrente, a seconda che l'uso sia la protonterapia o la produzione di radioisotopi.

Per le esperienze di radiobiologia, importanti per una corretta valutazione degli effetti biologici dei protoni, che possono essere diversi da quelli, già noti, indotti da radiazioni X e gamma, si è ritenuto di deviare parte del fascio di protoni da 7 MeV destinato alla produzione di radioisotopi e di indirizzarlo in una sala attigua, destinata alla sperimentazione radiobiologica.

Tabella 13. - Specifiche di protonterapia

Parametri	Valori del TOP Linac
Valori operativi dell'energia	65 MeV (Beam-1) 82 MeV (Beam-2/3) 100 MeV (Beam-2/3) 100-200 MeV (variabile) (Beam-2/3)
Spread di energia	< 0,75 % tra 65 e 200 MeV
Precisione dell'energia	< 0,4 MeV
Emittanza trasversa	< 1,2 p mm mrad
Intensità di corrente media	0,1 - 5 nA a tutte le energie
Valori impulsivi della corrente (max)	10 mA, 5 ms
Numero di protoni per impulso (max)	3 10 ⁶ - 3 10 ⁸
Frequenza di ripetizione	10 - 400 Hz
Numero di impulsi in 1 min a 400 Hz	24 000
Rateo di dose massimo	2 Gy/min in un vol. 20x20x10 cm ³

Il progetto preliminare effettuato in questi anni ha riguardato anche l'impianto nella sua globalità. Il sito individuato per l'installazione corrisponde all'area dell'Istituto Superiore di Sanità contigua all'Istituto Regina Elena, con lo scopo di permettere la gestione dell'apparato e l'uso diretto del fascio al personale dell'Istituto oncologico per la ricerca e l'applicazione clinica, mentre si potrà utilizzare contemporaneamente lo stesso fascio per la ricerca fisica e radiobiologica e per la produzione di radioisotopi.

Le attività di dosimetria e microdosimetria hanno riguardato: 1) lo sviluppo di un calorimetro ad acqua per la misura assoluta di dose; 2) lo studio della risposta del sistema dosimetrico alanina/EPR a fasci di protoni; 3) la caratterizzazione del sistema dosimetrico gel-Fricke/NMR; 4) la valutazione dell'utilizzo di camere a ionizzazione multisettore per il monitoraggio del fascio dell'acceleratore TOP Linac.

Le attività in biofisica e radiobiologia dei protoni hanno riguardato tre principali linee di ricerca: a) caratteristiche biofisiche e radiobiologiche dei protoni; b) metodi di valutazione dell'efficacia biologica di pro-

toni nelle condizioni di interesse terapeutico; c) sviluppo di test predittivi della risposta tumorale alla radioterapia con protoni.

L'attività relativa alla rete multimediale per la terapia con protoni ha avuto come scopo lo sviluppo di strumenti hardware e software in grado di consentire l'acquisizione, la trasmissione via rete e l'analisi dell'insieme di informazioni rilevanti per la terapia con fasci di protoni.

Costituiscono obiettivi della linea di ricerca: a) la definizione, in termini informativi, di una cartella clinica oncologica; b) il confronto di soluzioni tecnologicamente avanzate per la trasmissione di dati; c) la valutazione di metodi per l'analisi, la gestione e la compressione delle immagini.

L'implementazione di un sistema avanzato per piani di trattamento radioterapici ha richiesto l'individuazione e la collaborazione di specialisti che hanno consentito di pianificare lo sviluppo del progetto.

Tra i risultati già ottenuti si ricordano l'implementazione del software in ambiente UNIX. E' importante sottolineare che la versione definitiva del programma completo dovrà essere compilata ed eseguita su

stazioni di lavoro DEC, il cui sistema operativo è UNIX. Ciò comporta che tutti i programmi, o porzioni di essi, da integrare in quello definitivo, non essendo stati concepiti per lavorare in tale ambiente, debbano essere opportunamente modificati per essere resi compatibili.

Questo lavoro è stato avviato da tempo e ciò di cui attualmente si dispone è:

a) L'algoritmo di calcolo delle distribuzioni di dose per i fasci di fotoni ed elettroni "tradotto" in FORTRAN per UNIX e compilato.

b) Il modulo DDIS di visualizzazione dei dati anatomici (set di immagini CT), dei volumi di interesse e delle curve isodose attualmente in uso al PSI (sviluppato in ambiente PV-Wave).

c) L'algoritmo di calcolo delle distribuzioni di dose per i fasci di protoni solo parzialmente sottoposto al processo di "traduzione". Ciò è legato in parte alla complessità dell'algoritmo stesso, che richiede in questa fase una collaborazione costante con gli interlocutori del PSI.

d) Messa a punto in ambiente AVS di una routine per la visualizzazione 3D dell'anatomia del paziente (parte del programma sviluppata *ex novo*). Essa consente di immagazzinare e gestire in modo molto accurato le informazioni dello studio diagnostico del paziente, prevede inoltre la possibilità di realizzare il "contouring" dei volumi d'interesse, a differenza del modulo DDIS del PSI.

L'unico problema di delicata soluzione al momento sembra essere legato alla velocità di esecuzione, che diventa immediatamente insoddisfacente quando la mole di dati da gestire dinamicamente comincia a crescere. E' stata comunque attivata una collaborazione con un gruppo statunitense per lo studio delle applicazioni in ambito medico dell'AVS per l'analisi della questione.

In definitiva, l'attività svolta nel triennio ha fornito le indicazioni di base per l'attività di realizzazione effettiva del prototipo, che vedrà impegnati i ricercatori ancora per diversi anni, nell'ipotesi che il flusso dei finanziamenti continui al livello necessario.

3.1.9 Sclerosi multipla

Le principali attività gestionali e organizzative del Comitato scientifico del progetto "Sclerosi multipla", nominato con DM 6 marzo 1995, sono:

Primo progetto "Sclerosi multipla" (fondi dell'anno 1993)

Nei primi mesi del 1995 è stato perfezionato, previa consultazioni con i membri del Comitato scientifico, il testo del bando (Call for proposals) da diffondere in tutta Italia per la presentazione delle proposte di ricerca. I fondi totali disponibili (2800 milioni di lire), una volta sottratta una quota di 250 milioni per l'attività di gestione e per i potenziali compensi al personale da implicare nel progetto, sono stati suddivisi tra due sottoprogetti come segue: 1050 milioni per il sottoprogetto 1 "Eziopatogenesi"; 1500 milioni per il sottoprogetto 2 "Studi clinici, epidemiologici e assistenziali". Contemporaneamente è stato allestito un indirizzario (circa 600 destinatari) delle persone e degli enti potenzialmente interessati, basato sugli indirizzari di varie società scientifiche italiane, ed è stata preparata una lista di circa 250 revisori (referee) esterni, italiani e stranieri, suddivisi per aree di competenza, da utilizzare per la valutazione delle proposte di ricerca, dopo avere chiesto per iscritto la loro disponibilità a svolgere questo lavoro.

Il bando, stampato nel *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*, Vol. 8, n. 5 (Suppl. 2), 1995, è stato spedito ai suddetti indirizzi, oltre che ai destinatari abituali del *Notiziario* stesso. La scadenza per la presentazione delle proposte di ricerca è stata fissata all'11 settembre 1995.

Sono pervenute 104 proposte di ricerca, tra cui una da un laboratorio dell'ISS, che

sono state inviate a tutti i membri del Comitato scientifico e smistate a 176 revisori (in media 5 revisori per proposta; per le richieste di finanziamento più elevate, e per le proposte pervenute solo in lingua italiana con un riassunto in inglese poco informativo, il numero dei revisori è stato portato a 6-7). L'assegnazione delle proposte ai revisori è stata gestita da un software predisposto *ad hoc* che teneva conto sia delle aree di competenza che di eventuali conflitti di interesse. Correzioni manuali sono state effettuate laddove si ravvedevano evidenti conflitti di interesse non evidenziati dai dati immessi nel computer o sovraccarico su alcuni revisori.

I dati relativi alle proposte, compresi dati statistici riguardanti la provenienza, l'entità delle richieste, la distribuzione tra sottoprogetti, ecc., sono stati inviati ai membri del Comitato scientifico, in modo che ne prendessero visione prima della riunione dedicata alle valutazioni finali. Tale riunione si è tenuta presso l'ISS nei giorni 5-6 novembre 1995.

Nel corso della riunione del Comitato scientifico le proposte di ricerca sono state analizzate individualmente e ad ognuna di esse è stata data una valutazione finale, basata sui giudizi pervenuti e sulle valutazioni dei membri del Comitato scientifico stesso competenti per le varie aree di ricerca. E' stata fatta una classificazione delle proposte in base alla priorità e, in conclusione, sono state finanziate 44 unità operative, con un finanziamento medio di lire 57 950 000. Dato che un maggior numero di proposte giudicate di alta priorità riguardavano temi di ricerca inerenti al sottoprogetto 1, rispetto al sottoprogetto 2, il Comitato scientifico ha deciso di far fronte a questa situazione modificando la distribuzione di fondi tra i due sottoprogetti come segue,

sottoprogetto 1: lire 1612 milioni, sottoprogetto 2: lire 938 milioni.

Tra le proposte pervenute ne è stata finanziata, con 55 milioni, una proveniente dall'ISS, a cui afferiscono ricercatori del Laboratorio di Fisiopatologia di organo e sistema, compreso il responsabile scientifico del progetto. Le successive operazioni amministrative sono state affidate alla Divisione X dell'ISS.

Le procedure di assegnazione sono state in genere perfezionate nel primo quadrimestre (in molti casi nel primo bimestre) del 1996. I ritardi che vi sono stati in alcuni casi sono da attribuire a problemi amministrativi degli enti percettori delle somme e non all'amministrazione dell'ISS che ha agito con estrema sollecitudine.

A tutti i responsabili delle proposte di ricerca pervenute, sia quelle finanziate che quelle non finanziate, sono stati inviati i giudizi dei revisori e la valutazione finale del Comitato scientifico.

Secondo progetto "Sclerosi multipla" (fondi degli anni 1994-1995)

Dato che i fondi assegnati al progetto su base annua sono stati di 2 miliardi anziché di 2,8 miliardi, e che questa somma avrebbe consentito al massimo di rinnovare il finanziamento a unità (o parte delle unità) finanziate in seguito al 1° bando, il Comitato scientifico ha concordemente proposto di riunire in un unico bando biennale i fondi disponibili (totale 4 miliardi) al fine di dare spazio ad eventuali nuovi progetti meritevoli, che coprissero aree di ricerca importanti per il raggiungimento degli obiettivi prefissati. Dopo aver verificato la fattibilità amministrativa, è stato allestito un secondo bando nazionale che è stato diffuso nel novembre 1996, con le modalità descritte per il 1° bando. Una volta sottratta una

quota di 400 milioni per l'attività di gestione e per i potenziali compensi al personale da arruolare per il progetto, i fondi disponibili sono stati tentativamente così distribuiti: sottoprogetto 1 "Eziopatogenesi": 2250 milioni; sottoprogetto 2 "Studi clinici, epidemiologici e assistenziali": 1350 milioni.

La scadenza per la presentazione delle domande di estensione del finanziamento al biennio successivo o delle nuove proposte è stata fissata all'8 gennaio 1997. La procedura di valutazione è stata uguale a quella descritta nel precedente paragrafo, salvo il fatto che, nel caso di prosecuzione di ricerche già finanziate, revisori e Comitato scientifico hanno valutato sia il rendiconto scientifico delle attività svolte nel primo anno, che il progetto di ricerca. Inoltre i progetti sono stati inviati sistematicamente ad almeno 6 revisori anziché 5.

A seguito di questo secondo bando sono pervenute 134 proposte, di cui 95 nuove e 39 prosecuzioni. Si noti che le richieste di prosecuzione sono state inferiori rispetto alle ricerche finanziate in seguito al 1° bando, che erano 44.

Il Comitato scientifico si è riunito per le valutazioni finali e la definizione delle priorità nei giorni 17 e 18 marzo 1997. A seguito di questa riunione sono state considerate ad alta priorità 32 richieste di prosecuzione di ricerche già avviate e 24 nuove proposte di ricerca, di cui due sono state finanziate con fondi residui dal primo bando (fondi non utilizzati dagli enti cui erano stati assegnati). Dall'interno dell'ISS sono pervenute e sono state finanziate due proposte, di cui una nuova (finanziamento: 75 milioni) e una già finanziata nell'ambito del 1° progetto (finanziamento: 65 milioni).

Nel globale, i fondi del secondo progetto sono stati così distribuiti, sottoprogetto 1: 2390 milioni; sottoprogetto 2: 1210 mi-

lioni; per un totale di 56 unità finanziate con un finanziamento medio di 64 milioni. Le procedure di assegnazione sono state in gran parte perfezionate nel secondo quadrimestre del 1997.

Osservazioni riguardo alla risposta ai due bandi (1995 e 1996)

Il numero delle proposte di ricerca pervenute in seguito al 1° e 2° bando è stato rilevante. Questo riflette il notevole interesse che riscuote nel nostro paese (ma anche in altri) la malattia oggetto del progetto di ricerca, ma anche la scarsità generale di finanziamenti per la ricerca da parte di altri enti. Quest'ultima situazione ha fatto sì che un numero significativo di proposte siano pervenute da gruppi che non avevano precedente esperienza su ricerche relative alla sclerosi multipla. In alcuni casi tali proposte sono risultate di elevato valore scientifico e fattibili, e sono state finanziate con la filosofia che una delle ricadute positive del progetto è anche quella di attrarre gruppi di ricerca altamente qualificati verso un tema di grande interesse scientifico e sociale.

Un'altra osservazione generale riguarda il fatto che non tutti i temi di ricerca previsti dal bando sono stati coperti dalle proposte pervenute. Questo riguarda in modo particolare la copertura solo parziale di temi del sottoprogetto 2, che pur hanno un notevole interesse per il Servizio sanitario nazionale, quali ad esempio studi di efficacia relativa di terapie farmacologiche, studi di confronto di terapie riabilitative, studi sulla qualità dell'assistenza e aspetti psicosociali del carico familiare. Le cause alla base della carente risposta (o per lo meno della carenza di proposte di elevata qualità) in questo campo sono molteplici, ma almeno in parte riflettono una situazione culturale generale nel nostro paese, che mostra assai migliori

competenze nel campo degli studi eziopatogenetici che non in quelli, ad esempio, su riabilitazione, assistenza e servizi.

Infine, è stato notato dal Comitato scientifico, come pure dai valutatori esterni, che in media la qualità delle proposte pervenute a seguito del 2° bando è stata superiore a quella delle proposte relative al 1° bando, e questo anche per alcune di quelle aree di ricerca inerenti al sottoprogetto 2, menzionate nel paragrafo precedente.

Questa osservazione conferma l'alto potenziale promozionale ed educativo di progetti di ricerca nazionali su importanti temi sanitario-sociali quale il progetto "Sclerosi multipla".

Attività scientifica

1) Nell'ambito dell'attività scientifica è stato organizzato un simposio internazionale (30 novembre - 2 dicembre 1995), che è stato in gran parte focalizzato sul ruolo delle cellule gliali nella patogenesi della sclerosi multipla. A tale simposio hanno partecipato circa 80 persone, comprendenti 34 relatori invitati, di cui 30 stranieri, provenienti da Canada, Stati Uniti, Europa, Australia e Giappone. Gli abstract del simposio sono stati pubblicati sul *Journal of Neuroimmunology*.

2) Più direttamente pertinente al progetto è stata l'organizzazione di un convegno di "progress report" in data 28 e 29 novembre 1996, in cui tutti i responsabili dei gruppi finanziati hanno riferito sui loro risultati, spesso preliminari, attinenti al primo periodo di attività (è da notare che tale periodo è stato comunque inferiore a un anno, e in alcuni casi di solo pochi mesi). A tale convegno, che ha preceduto di poco la presentazione dei progetti di ricerca relativi al 2° bando, hanno partecipato tutti i membri del Comitato scientifico, che hanno così

avuto modo di valutare direttamente lo stato dei lavori e le prospettive di sviluppo. I riassunti dei rendiconti presentati al convegno sono stati raccolti in un rapporto, a cura della Segreteria del progetto "Sclerosi multipla" e del Servizio per le attività editoriali dell'Istituto.

Salvo casi sporadici, l'attività scientifica è parsa ben avviata, e sarà possibile, dopo il prossimo convegno di "progress report" previsto per la primavera 1998, dare una valutazione più completa.

Pubblicazioni scientifiche e abstract di congressi

All'inizio del mese di ottobre 1997 è stata inviata una lettera a tutti i responsabili dei

gruppi di ricerca finanziati nell'ambito del 1° e 2° progetto, chiedendo di trasmettere la documentazione relativa alle pubblicazioni, abstract o altre attività svolte nell'ambito del progetto. Sebbene non tutti abbiano risposto, e considerato che il progetto è in fase operativa da circa solo 18 mesi e che per alcuni studi non sono stati previsti prodotti in una fase intermedia, la documentazione pervenuta indica che il progetto ha promosso una notevole attività scientifica, così riassumibile: 31 lavori sono apparsi su riviste internazionali, 27 lavori sono stati inviati in pubblicazione e 71 comunicazioni sono state presentate a congressi a livello sia nazionale che internazionale.

3.1.10 Studio della listeriosi alimentare e umana e realizzazione di un sistema sperimentale di sorveglianza

Il progetto è stato messo in atto dall'Istituto Superiore di Sanità in relazione all'applicazione del DLvo 30/12/1992, n. 502 e si articola lungo due direttrici, clinico-epidemiologica e tecnologico-sanitaria; prevede, inoltre, ricadute nel quadro del Piano sanitario nazionale.

Aspetti clinico-epidemiologici

Incidenza nella popolazione umana e nei prodotti abortivi umani. - Nel settembre 1996 è stata stipulata una convenzione, della durata di 12 mesi, tra l'Istituto Superiore di Sanità e il Centro interdipartimentale per le malattie sociali (CIMS) dell'Università degli Studi "La Sapienza" di Roma, al fine di avviare una sorveglianza degli aborti e parti prematuri per valutarne la correlazione con l'infezione da *Listeria monocytogenes*.

Il monitoraggio è stato condotto presso ambulatori e cliniche ginecologiche, cliniche pediatriche e reparti di neonatologia del Policlinico "Umberto I" di Roma.

A tale scopo sono stati distribuiti protocolli per la raccolta degli specifici campioni biologici e schede per la raccolta delle informazioni relative al paziente. I campioni biologici vengono inviati al Reparto di microbiologia degli alimenti per la ricerca e l'identificazione della *Listeria monocytogenes*, mediante test biochimici e immunoenzimatici.

Sempre nell'ambito di tale convenzione sono altresì in corso studi per valutare la virulenza di ceppi di *Listeria monocytogenes*, con test *in vivo* (DL₅₀ nel topino) e in parallelo con test *in vitro* (invasività e moltiplicazione in linee cellulari). Lo studio si pre-

figge di valutare i risultati ottenuti con i due test, al fine di verificare la possibilità di sostituire il modello animale con un test *in vitro*.

Tipizzazione molecolare. - Sono state messe a punto due tecniche molecolari, PFGE e RAPD, per la tipizzazione di ceppi di *Listeria monocytogenes*. Tali tecniche vengono in particolar modo utilizzate per stabilire l'eventuale correlazione fra ceppi isolati da campioni biologici, campioni alimentari e campioni ambientali, mediante il confronto dei profili genetici. Queste tecniche si sono rivelate utili nel corso di inchieste epidemiologiche svolte durante la sorveglianza di casi di listeriosi, per poter stabilire l'eventuale coinvolgimento di un alimento nell'infezione.

Inoltre, le due tecniche molecolari sono state utilizzate per la tipizzazione di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da diversi tipi di carne, sia fresca che trasformata, allo scopo di identificare i cloni presenti sul territorio nazionale.

Correlazione consumo alimenti-casi umani. - E' stato possibile dimostrare in 3 casi sporadici di listeriosi, verificatisi uno in provincia di Bologna e due in provincia di Verona, e in un esteso episodio verificatosi nella provincia di Torino, che ha coinvolto circa 950 individui non immunocompromessi, la correlazione con gli alimenti consumati dai pazienti.

Nei tre casi sporadici, non essendo state svolte indagini epidemiologiche immediatamente dopo l'accertamento dell'infezione, è stato possibile risalire all'alimento contaminato, grazie al ricorso alle tecniche di tipizzazione molecolare. Infatti, il confronto fra i profili genetici dei ceppi isolati dai campioni biologici dei pazienti e quelli dei

ceppi isolati dagli alimenti, reperiti presso i frigoriferi dei pazienti o presso i loro fornitori abituali, ha consentito di stabilire l'identità genetica fra i ceppi e quindi l'individuazione dell'alimento responsabile dell'infezione.

Nell'episodio torinese, invece, sono state svolte immediatamente le indagini epidemiologiche, per cui sono stati subito analizzati, per la ricerca della *Listeria monocytogenes*, gli alimenti consumati dai pazienti. La tipizzazione molecolare dei ceppi isolati dai pazienti e dei ceppi isolati dagli alimenti ha consentito di individuare, fra tutti gli alimenti incriminati, l'alimento veicolo dell'infezione.

Aspetti tecnologico-sanitari

Incidenza negli alimenti in funzione delle caratteristiche di conservazione. - E' stato condotto uno studio sugli effetti della surgelazione in cellule di *Listeria monocytogenes*, inoculate in cinque diversi tipi di alimenti.

Sono stati selezionati alimenti sia di origine animale che vegetale, con valori di Aw diversi, e sono stati inoculati con concentrazioni note di cellule di *Listeria monocytogenes*. Immediatamente dopo l'inoculazione, gli alimenti sono stati surgelati in un impianto industriale pilota a -50°C per 57 min e conservati a -18°C per 8-10 mesi, seguendo le procedure adottate dalle industrie di alimenti surgelati.

I risultati mostrano che tale trattamento di conservazione provoca solo una lieve riduzione (da 0,1 a 1,6 log) del numero di cellule vitali di *Listeria monocytogenes* e che, fra tutti gli alimenti analizzati, il pesce ha l'effetto crioprotettivo più basso.

Fattori tecnologici di controllo della moltiplicazione. - Sono state saggiate *in vitro*

due sostanze, lisozima in combinazione con lipasi e una sostanza prodotta da un *Lactobacillus* denominato GG, al fine di verificare la loro attività antimicrobica nei confronti di cellule di *Listeria monocytogenes*, sia in fase stazionaria che in fase esponenziale.

I risultati ottenuti indicano una buona attività di controllo della moltiplicazione della *Listeria monocytogenes* da parte del sistema lisozima/lipasi, anche se l'effetto antimicrobico è dipendente dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione di NaCl del terreno colturale di crescita del microrganismo.

Per quanto riguarda la sostanza prodotta dal *Lactobacillus* GG, si evidenzia, in fase di crescita esponenziale del microrganismo, un diverso comportamento dei ceppi a secondo del sierotipo e dell'origine: i ceppi appartenenti al sierotipo 1 e quelli di origine umana risultano più sensibili rispetto a quelli appartenenti al sierotipo 4 e a quelli di origine alimentare. In fase stazionaria si verifica un decremento dell'ordine di 1 log nel ceppo di origine umana Scott A.

Studi ulteriori sono necessari per verificare l'applicabilità di tali sostanze alle matrici alimentari.

Risultati attesi nel quadro del Piano sanitario nazionale

Identificazione dei fattori di rischio correlati alle infezioni alimentari da Listeria monocytogenes. - Nel settembre 1996 è stata stipulata una convenzione della durata di 12 mesi fra l'Istituto Superiore di Sanità e il Dipartimento di medicina sperimentale dell'Università dell'Aquila, al fine di valutare l'incidenza dell'antibiotico-resistenza in ceppi di *Listeria monocytogenes*.

A tale scopo sono stati saggiati 148 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da diverse