

RELAZIONE SCIENTIFICA

FORMAZIONE E TRASFERIMENTO DI METODOLOGIE INNOVATIVE AD IMPRESE DEL LAZIO O DEI PAESI DEL MEDITERRANEO COINVOLTE NELLO STUDIO DI INFEZIONI BATTERICHE, VIRALI, FUNGINE E PARASSITARIE

1. DESCRIZIONE DEL PROGRAMMA: OGGETTO, FINALITÀ, OBIETTIVI E RISULTATI FINALI RAGGIUNTI, VALIDAZIONE DEI RISULTATI CONSEGUITI.

Il progetto, grazie alle competenze nel campo delle malattie infettive presenti nel Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive (DSPMI), Università di Roma “La Sapienza”, si era proposto come obiettivo quello di mettere a punto, sviluppare e validare, rispetto ai metodi classici, metodi innovativi nelle diagnosi e nel monitoraggio del rischio di infezioni da batteri, miceti, virus, protozoi ed elminti patogeni e insetti vettori, come pure di formare giovani ricercatori in grado di applicare le metodologie innovative presso i laboratori dimostrativi del DPSMI e/o di esportarle presso altre strutture pubbliche e private interessate a migliorare le proprie competenze in Sanità Pubblica.

La proposta di progetto era articolata secondo linee di ricerca trasversali per i diversi gruppi di ricerca del Dipartimento (Microbiologia, M; Malattie Infettive, MI; Parassitologia, P; Igiene, I; Statistica, S) e i risultati ottenuti sono riassunti di seguito in accordo con il Progetto originale e lo schema a pagina 2.

Per quanto riguarda l’obiettivo di formazione di giovani ricercatori nelle metodologie innovative di cui sopra, sono stati formati reclutati nell’ambito del progetto 2 Assegnisti di Ricerca annuali, 2 borsisti annuali e 11 borsisti semestrali, che sono stati coinvolti nelle attività di ricerca delle diverse Unità Operative.

	MICROBIOLOGIA	PARASSITOLOGIA	MALATTIE INFETTIVE	IGIENE
Linea 1 - Strumenti innovativi per la diagnosi di patogeni	M-1.1 Metodi innovativi per la conta di batteri aggregati, adesi o in biofilm	P-1.1 Metodologie innovative per la diagnosi di parassitosi umane e zoonotiche	MI-1.1 Sonicazione per la conta di batteri aggregati, adesi o in biofilm	
	M-1.2- Metodi innovativi il controllo di qualità microbiologica di bio- e nano-materiali	P-1.2 Metodologie innovative per la determinazione qualitativa e quantitativa di parassiti zoonotici nei prodotti ittici.		
	M-1.3- Metodo innovativo per la valutazione della sensibilità agli antibiotici di biofilm batterici			
	M-1.4 Metodi innovativi per l'isolamento e caratterizzazione di Polyomavirus e virus respiratori in campioni biologici			
Linea 2 - Strumenti innovativi per la valutazione del rischio da agenti patogeni e da contaminanti ambientali	M-2.1 Strumento innovativo per la valutazione del rischio di infezione da Citomegalovirus	P-2.1 Strumenti innovativi per il monitoraggio e sorveglianza entomologica di insetti vettori di patogeni animali e zoonotici		I-2.1 Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni ospedalieri di provenienza sia ambientale che clinica da utilizzarsi in protocolli di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all'assistenza nei reparti a più elevato rischio di infezione.
		P-2.2 Strumenti innovativi per la valutazione dell'esposizione umana a insetti vettori di parassitosi e arbovirus		I-2.2 Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni alimentari di provenienza sia alimentare che clinica da utilizzarsi nel processo di Rapid Risk Assessment a livello Posti di ispezione frontiera.
		P-2.3 Strumenti per la identificazione di farmacoresistenze in Plasmodi della malaria		
		P-2.4 Strumenti innovativi per la valutazione del rischio di allergie nell'uomo da parassiti zoonotici		
Linea 3 - Implementazione di tecnologie innovative di interesse in sanità pubblica	M-3.1 Nuovi generatori di onde acustiche per processi di sterilizzazione	P-3.1 Metodi innovativi per la valutazione dell'efficacia di interventi di controllo contro insetti molesti e/o vettori di patogeni umani e zoonotici		
		P-3.2 Applicazione di biosaggi per la valutazione di semiochimici repellenti/attrattivi per insetti ematofagi		
Linea 4 - Metodologie statistiche per la gestione e elaborazione dati in sanità pubblica	S-1.1 Validazione statistica di nuove metodologie diagnostiche (linea 1)			
	S-1.2 Validazione statistica di nuove metodologie per la valutazione del rischio da agenti patogeni e da contaminanti ambientali (linea 2)			
	S-1.3 Validazione statistica di nuove metodologie in sanità pubblica (linea 3)			
	S-2.1 Metodologie statistiche per l'elaborazione dati in Sanità Pubblica			

LINEA 1: STRUMENTI INNOVATIVI PER LA DIAGNOSI DI PATOGENI

Le diagnosi innovative ideate, messe a punto e verificate in parallelo alle metodiche classiche, riguardano le diagnosi di infezioni associate a batteri, virus e parassiti.

METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA DIAGNOSI DI BATTERI

M1.1- Metodi innovativi per la conta di batteri adesi in biofilm e per l'antibiogramma diretto su batteri adesi in biofilm a cateteri venosi centrali. Controllo di qualità microbiologica di bio- e nano-materiali.

Gli obiettivi del progetto consistevano nell'enumerare i microorganismi adesi, aggregati e in biofilm colonizzanti cateteri venosi centrali e nell'eseguire l'antibiogramma direttamente sui cateteri con metodi alternativi rispetto a quello classico basato sulla Conta delle Unità Formanti Colonie (UFCs).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che un metodo innovativo, denominato BioTimerAssay (BTA), permette di contare i microorganismi adesi o in biofilm, senza manipolare il campione, utilizzando un reattivo originale che contiene o un indicatore come il rosso fenolo in grado di cambiare colore a causa del metabolismo microbico di batteri fermentanti o un altro indicatore come la resazurin in grado di cambiare colore a causa del metabolismo microbico di batteri non fermentanti.

Poiché BTA non necessita di alcuna manipolazione del campione, esso supera i limiti del metodo di Cleri che, invece, tratta il campione, non fornisce alcuna certezza sul distacco dei batteri adesi in biofilm ed impiega altresì per la risposta analitica tempi estremamente superiori rispetto a quelli richiesti dal BTA (48-72 h rispetto al massimo 12 h).

Le analisi microbiologiche comparative tra il metodo di Cleri ed il BTA sono state oggetto di una pubblicazione in: Rosa et al. 2017 J Microbiol Methods, 143, 20-25. BTA è stato applicato con successo nel controllo di sterilità di bio- e nano-materiali.

M1.2 - Concentrazione intracellulare di metalli in impianti protesici mediante raggi X.

Questa linea di ricerca è stata aggiunta nel secondo anno per ampliare le conoscenze scientifiche sugli impianti protesici. Infatti, le protesi, per poter permanere in vivo, richiedono una colonizzazione delle cellule dell'ospite post impianto. Nonostante la colonizzazione cellulare, gli impianti possono essere affetti da peri-implantiti, infezioni associate a batteri. Molto è noto in letteratura sull'infezioni batteriche che avvengono in fase precoce e cioè prima della colonizzazione delle cellule dell'ospite. Al contrario, recentemente, è stata osservata l'infezione di protesi già ricoperte, e quindi colonizzate, dalle cellule dell'ospite. Le infezioni dell'impianto già colonizzato (fase tardiva) possono essere dovute a batteri commensali che restano adesi alla superficie cellulare o a batteri patogeni che possono penetrare all'interno delle cellule, provocando un'inflammatione patologica con danno cellulare e conseguente perdita dell'attaccamento della protesi.

Pertanto tutti i nutrienti e *nutriliti* fondamentali per la replicazione cellulare e la sua conseguente colonizzazione dell'impianto non sono stati approfonditamente analizzati in quanto richiedono determinazioni nanometriche. Mentre le fonti di carbonio e azoto, presenti in vivo, sono facilmente analizzabili, i *nutriliti* come Fe, Cu, Zn, Mn, Mg, P e K, essendo presenti in concentrazioni nanomolari, possono essere analizzati solo con tecniche sofisticate ed innovative come ad esempio i raggi X. Recentemente, il Sincrotrone di Grenoble si è offerto di ospitare le nostre sperimentazioni presso una beamline dedicata allo studio delle cellule umane. Presso il Sincrotrone di Grenoble, abbiamo potuto mettere a punto una serie di tecniche d'avanguardia che hanno permesso di analizzare, in diverse condizioni sperimentali, la concentrazione e localizzazione dei più importanti

nutriliti quali Fe, K e P, dimostrando che la concentrazione di Fe intracellulare è maggiore in cellule infiammate e può essere la causa dell'aumento della suscettibilità delle protesi all'infezione.

M1.3 - Metodi innovativi per la conta di batteri adesi in biofilma pacemaker ed a elettrodi atriali e ventricolari.

Se da una parte è vero che la conta delle UFC è l'unico metodo validato e universalmente applicato, dall'altra crea un impedimento alla validazione di metodi di conta alternativi in quanto questo metodo ha un'ambiguità di fondo: la stessa definizione di conta delle UFC deve far riflettere perché il termine UNITA' non significa un singolo batterio ma un numero imprecisato di batteri da cui deriva una colonia.

In questa ricerca, visto i risultati incoraggianti ottenuti con i cateteri venosi centrali infetti ed espuntati al Policlinico Umberto I (Linea di Ricerca M1.1), abbiamo voluto verificare se il metodo BioTimer fosse applicabile anche per enumerare i batteri adesi o in biofilm a pacemaker e a elettrodi atriali e ventricolari forniti dal prof. Mastroianni afferente alla Sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive (MI 1.1).

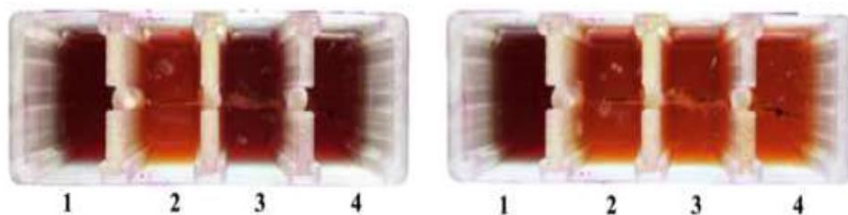
Il gruppo coordinato dal Prof Mastroianni, al fine di staccare i microrganismi aderenti a pacemakers e agli elettrodi atriali e ventricolari così da poter contare le UFC, ha modificato il metodo di Cleri aggiungendo all'uso del vortex, la sonicazione. Il trattamento per il distacco è consistito nell'uso del vortex-sonicazione-vortex (VSVM) e nella susseguente conta delle UFC.

In questa ricerca, abbiamo confrontato questo metodo, VSVM, con il BioTimer Assay (BTA), una nuova promettente metodica analitica in grado di contare, come già riportato nella sezione M1.1, direttamente i batteri aderenti ai dispositivi senza alcuna manipolazione del device cardiaco.

Per queste specifiche analisi, abbiamo messo a punto un reattivo originale contenente un'associazione di due indicatori come il fenolo-rosso e la resazurina al fine di determinare senza esclusione i batteri fermentanti e quelli non fermentanti. Il tempo richiesto per il viraggio degli indicatori è correlato al numero iniziale di batteri (N0) attraverso una curva di correlazione genere-specifica descritta dalla seguente equazione: $t = \log(1 + a / N0) / k$, dove "k" è il tasso di crescita e "a" è la funzione del prodotto metabolico responsabile del viraggio degli indicatori.

Inoltre, un nuovo apparato analitico è stato specificamente realizzato per contare i batteri aderenti lungo i diversi segmenti (prossimale, intermedio e distale) dell'elettrodo atriale e ventricolare rimosso per indagare sulla patogenesi dell'infezione da dispositivo cardiaco (Figura 1).

Figura 1: Nuovo apparato per alloggiamento dell'elettrodo atriale e ventricolare ed analisi dei diversi segmenti



Le conte eseguite con BTA richiedono un tempo più breve rispetto ai conteggi delle UFC distaccate con VSVM (12h rispetto a 48h). BTA, tuttavia, distingue solamente i batteri fermentanti dai non fermentanti senza discriminare specifici generi/specie, come, invece, può essere ottenuto sui batteri distaccati con VSVM mediante l'uso di terreni solidi selettivi, elettivi e differenziali. Nonostante BTA sia stato applicato dopo il trattamento VSV, il valore delle conte totali dei batteri adesi a ciascun componente del dispositivo cardiaco sono più alti di quelli rilevati da VSVM.

I dati ottenuti saranno oggetto di una Pubblicazione che verrà inviata ad una Rivista Internazionale prima della fine del 2018.

MI 1.1 - Strumenti innovativi per la diagnosi di batteri adesi a protesi ortopediche, defibrillatori, cateteri venosi centrali, dispositivi neurochirurgici

Con il progressivo aumento del posizionamento di corpi estranei (protesi ortopediche, defibrillatori, cateteri venosi centrali, dispositivi neurochirurgici), si è assistito a un progressivo aumento delle infezioni batteriche in biofilm. Come detto nella sezione M1.1 e M1.3 la diagnosi microbiologica delle infezioni associate al biofilm necessita dell'utilizzo di tecniche che siano in grado di staccare il biofilm dalla superficie del corpo estraneo. La sonicazione, una tecnica basata sull'utilizzo degli ultrasuoni che si irradiano in un liquido, ha dimostrato una maggiore sensibilità diagnostica rispetto alla coltura tradizionale ed è pertanto sempre più utilizzata al fine di migliorare la diagnosi microbiologica delle infezioni associate a corpo estraneo incluse quelle polimicrobiche. Tuttavia, uno dei limiti di tale tecnica è rappresentato dalla possibilità che batteri adesi a un corpo estraneo non vengano del tutto rimossi. Inoltre, essendo un metodo basato sulla coltura dei microrganismi, necessita di almeno 24-48h di crescita per permettere l'identificazione batterica. Tali limiti sono stati superati da un metodo innovativo, BTA, messo a punto dall'unità Valenti M1.1 e M1.3.

L'obiettivo è stato quello di valutare la sensibilità diagnostica della tecnica della sonicazione nell'ambito delle infezioni associate a dispositivi intracardiaci impiantabili (pacemaker/defibrillatori) e a dispositivi intravascolari (PICC, midline, CVC) e compararla con la metodica del BTA in campioni raccolti da Febbraio 2016 a Febbraio 2018.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che

- la concordanza tra i due metodi è elevata
- le risposte analitiche del numero dei batteri adesi mediante BTA necessitano di un minor tempo rispetto a quelle ottenibili mediante SVSM
- la diagnosi del genere e specie batterica può essere ottenuta solo con SVSM
- le analisi del numero dei batteri colonizzanti i diversi segmenti degli elettrodi, ottenibile solo con il nuovo apparato (vedi sezione M1.3), servono come strumento aggiuntivo per comprendere la patogenesi dell'infezione di un dispositivo cardiaco.

In conclusione, nel corso dell'intero progetto l'unità di Malattie Infettive ha potuto implementare la tecnica della sonicazione anche per dispositivi che all'inizio del progetto non erano routinariamente esaminati mediante tale tecnica (ad es. dispositivi intravascolari quali i PICC), confermandone il ruolo nel distaccare non solo i batteri ma anche i funghi presenti nel biofilm e dimostrando globalmente una sensibilità elevata (65.9%). Inoltre, mediante tale tecnica si sono potute mettere in evidenza infezioni polimicrobiche, che, in accordo con i dati della letteratura, rappresentavano il 10.4% delle infezioni totali. Inoltre, tale tecnica appare di facile esecuzione, rapida ed estremamente accurata. All'interno quindi dell'obiettivo generale del progetto, volto alla divulgazione e al trasferimento di metodologie innovative ad altre Imprese del Lazio coinvolte nello studio di infezioni batteriche e fungine, implementare la tecnica della sonicazione in laboratori di microbiologia, che attualmente ne sono sprovvisti, potrebbe rappresentare un utile strumento al fine di aumentare la sensibilità diagnostica nel caso di infezioni associate a biofilm.

M1.4 - Importanza del biofilm nelle infezioni genitali da *Chlamydia trachomatis*

L'obiettivo della ricerca è stato quello di studiare l'interazione tra *Chlamydia trachomatis* (la principale causa di infezione batterica sessualmente trasmessa) ed il biofilm di *C. albicans* o *G.*

vaginalis, altri microrganismi residenti nel microambiente cervico-vaginale. In particolare è stato valutato se *C. trachomatis* è in grado di sopravvivere nel biofilm e, al tempo stesso, mantenere la capacità infettante, una volta intrappolata nel biofilm. I risultati ottenuti suggeriscono che il biofilm prodotto da *C. albicans* o *G. vaginalis* può rappresentare un serbatoio di infezione per *C. trachomatis* favorendone la disseminazione nel tratto genitale superiore della donna e, così, lo sviluppo di sequele croniche come la malattia infiammatoria pelvica e l'infertilità. Inoltre, va sottolineato che il biofilm di *Candida* o *Gardnerella* associato ai sistemi intrauterini può anche contribuire alla trasmissione dell'infezione di *C. trachomatis* nella popolazione. Dall'analisi dei risultati è emerso che *C. trachomatis* rimane intrappolata nel biofilm, prodotto da *C. albicans* o da *G. vaginalis*, come evidenziato dall'assenza di corpi elementari di *Chlamydia* entro le 12 ore di esposizione al biofilm. Al contrario, a 24, 48 e 72 ore, il numero dei corpi elementari di *Chlamydia*, nei monostrati cellulari, aumentava significativamente all'aumentare del tempo di esposizione, suggerendo che *C. trachomatis* veniva rilasciata dallo stesso biofilm. Il dato più interessante emerso dalla ricerca è stato quello di dimostrare che *C. trachomatis* è in grado di conservare la capacità infettante, pur rimanendo intrappolata fino a 72 ore nel biofilm di *Candida* o di *Gardnerella*, come evidenziato dalla presenza delle inclusioni di *Chlamydia* riscontrate nei monostrati cellulari. E' stato anche osservato che *C. trachomatis* non altera la formazione di biofilm prodotto da *C. albicans* o da *G. vaginalis* dal momento che non è stato riscontrato un aumento significativo della biomassa di biofilm in presenza di *C. trachomatis*, rispetto al biofilm costituito esclusivamente da *Candida* o da *Gardnerella*. In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che il biofilm prodotto da *C. albicans* o *G. vaginalis* può rappresentare un serbatoio di infezione per *C. trachomatis* favorendone la disseminazione nel tratto genitale superiore della donna e, così, lo sviluppo di sequele croniche come la malattia infiammatoria pelvica e l'infertilità. Inoltre, va sottolineato che il biofilm di *Candida* o *Gardnerella* associato ai sistemi intrauterini può anche contribuire alla trasmissione dell'infezione di *C. trachomatis* nella popolazione.

METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONI VIRALI

M1.4b,c - Nuova metodologia per la determinazione di Polyomavirus umano JC.

Un primo obiettivo di questa linea di ricerca ha previsto lo sviluppo di un programma di screening in pazienti affetti da Sclerosi Multipla Recidivante Remittente (SMRR) allo scopo di valutare il rapporto rischio/beneficio associato all'uso di farmaci biologici ed alla riattivazione del Polyomavirus umano JC (JCV), agente eziologico della Leucoencefalopatia Multifocale progressiva (PML) in corso di terapia (M1.4a).

Parallelamente sono state messe a punto metodiche molecolari avanzate per la titolazione di virus a DNA ed a RNA, con particolare attenzione al virus HSV-1, e per la quantizzazione di batteri intracellulari, utilizzando la tecnica "in Cell Western" (ICW) grazie alla strumentazione "OdysseyCLx imaging System". Questa tecnica è stata quindi messa a confronto con l'analisi in Western Blot delle proteine virali, evidenziate col metodo classico della chemiluminescenza, utilizzando lo strumento Odyssey (M1.4b).

L'utilizzo della strumentazione Odyssey ha evidenziato che i risultati ottenuti sia dal punto di vista della titolazione virale che della quantizzazione di batteri intracellulari sono esattamente confrontabili con i risultati ottenuti mediante metodi tradizionali. La strumentazione Odyssey ha permesso di valutare l'espressione di proteine virali e cellulari anche a distanza di 24/48 ore dalla colorazione con gli anticorpi specifici grazie ad una maggiore stabilità e durata nel tempo del segnale. Inoltre è stato possibile evidenziare contemporaneamente proteine diverse con diversi anticorpi secondari così da aver ridotto i tempi di esposizione e di acquisizione dei risultati. Per

quanto riguarda la quantizzazione di batteri intracellulari, l'analisi della correlazione tra il numero di unità formanti colonie per millilitro (CFU/ml) ottenuto dalle conte in piastra e i valori a.u. ottenuti mediante il saggio ICW ha permesso di stabilire che entrambi i set di valori di CFU e a.u. aumentano durante il tempo con una relazione lineare.

METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA DIAGNOSI DI PARASSITI

P1.1a - Metodologie innovative per la diagnosi di Protozoi ematici

La ricerca è stata focalizzata sull'identificazione di parassiti a trasmissione ematica potenzialmente presenti in emoderivati ed, in particolare, sul protozoo *Babesia divergens*. Il protocollo di qPCR comunemente utilizzato si basa sull'amplificazione di una porzione di circa 120 bp del 18S rRNA ed ha una sensibilità del 100%, ma una bassa specificità. E' stato quindi sviluppato un nuovo protocollo TaqMan basato sul gene delle Beta-tubulina, un gene strutturale degli Apicomplexa ed è stato sviluppato un saggio di quantificazione su rette di calibrazione per *Babesia divergens*. Il test ha mostrato una buona efficienza di amplificazione e un'elevata specificità.

Al fine di sviluppare di un test immunologico per la diagnosi di *B. divergens* nell'uomo, è stata valutata la sensibilità e la specificità di due antigeni metabolici isolati in uno studio precedente (37KDa e 33KDa) testando in Western Blot, sieri di controllo di gerbilli e vitelli infettati sperimentalmente e sieri di bovini affetti da specie affini e di pazienti potenzialmente esposti al parassita per la loro attività professionale (allevatori N=80). L'antigene di 37KDa ha mostrato una maggiore specificità e sensibilità, ed è quindi risultato più idoneo ed essere considerato un possibile candidato per lo sviluppo in commercio di kit immunologici (ELISA, WB, RDT) per la diagnosi di *B. divergens* nell'uomo e negli animali.

P1.1b - Caratterizzazione genetica di elminti zoonotici da contaminazione ambientale.

E' stata condotta una caratterizzazione genetica di esemplari di trasmissione di elmintosi a trasmissione zoonotica (*Echinococcus* spp e *Ascaris* spp) da vari pazienti umani e ospiti animali, con lo scopo di stimare i genotipi circolanti nel bacino del Mediterraneo e in altre regioni endemiche. L'identificazione a livello di specie è stata effettuata mediante sequenziamento della regione cox1, marcatore di noto valore tassonomico. I risultati descrivono almeno vari genotipi noti circolanti in questi Paesi e alcune "microvarianti". Grazie ad una precisa identificazione degli agenti eziologici di echinococcosi ed ascariasi è stato possibile definire accuratamente i genotipi circolanti nel territorio di studio (Italia, Spagna, Slovacchia e Romania, Iraq, Colombia). La ricerca ha evidenziato che per entrambe le parassitosi è necessario l'utilizzo di strumenti molecolari sofisticati per la corretta identificazione del patogeno, e la necessità di integrare informazioni da più loci genetici per avere un quadro epidemiologico attendibile. Le informazioni raccolte saranno utili per sviluppare modelli predittivi di rischio e di diffusione dei due patogeni.

P1.2 - Determinazione di parassiti zoonotici nei prodotti ittici

La ricerca è stata focalizzata sull'identificazione di specie di nematodi zoonotici legati al consumo di pesce appartenenti ai generi *Anisakis* (*A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii*), *Pseudoterranova* (*P. decipiens* (s.s.), *P. krabbei*, *P. bulbosa*), e di nematodi non-zoonotici (es. *Hysterothylacium aduncum*), che parassitano, allo stadio larvale, specie ittiche di interesse commerciale in acque Europee. Per questo obiettivo sono stati messi a punto sistemi primers/sonde specie-specifici, costruiti su sequenze del gene mtDNA cox2, da utilizzare in real time PCR-DNA. Ogni coppia di primers e relativa sonda, sono stati disegnati in punti diversi della sequenza del gene

mtDNAcox2che presentava basi diagnostiche per ciascuna specie. Per ogni specie di parassita, è stata realizzata una curva di calibrazione per poter effettuare la quantificazione di un campione *unknown* di DNA. Dopo aver verificato la corretta funzionalità dei primers e delle relative sonde, è stata verificata la loro applicabilità anche in reazioni in *multiplex*, in cui nella mix sono stati inseriti tutti i sistemi "primers/sonda" specifici per le specie in esame. L'utilizzo di questi sistemi primers/sonde specie specifici, hanno permesso di ottenere un buon risultato, consentendo di poter discriminare la presenza di 4/5 specie con un'unica reazione di amplificazione. I risultati sono stati pubblicati su rivista internazionale: Paoletti et al. (2017). Species-specific Real Time-PCR primers/probe systems to identify fish parasites of the genera *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium* (Nematoda: Ascaridoidea). FisheriesResearch, doi.org/10.1016/j.fishres.2017.07.015; Mattiucci et al. (2017). Invasive anisakiasis by the parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): diagnosis by Real-Time PCR hydrolysis probe system and Immunoblotting assay. BMC Infectious Diseases, 17: 530. doi.org/10.1186/s12879-017-2633-0.

LINEA 2: STRUMENTI INNOVATIVI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI PATOGENI E DA CONTAMINANTI AMBIENTALI

M2.1 - Test molecolari nello screening dell'infezione congenita da Citomegalovirus

La finalità del presente progetto era quella di fornire un metodo rapido e automatizzato, utile a riconoscere tempestivamente l'infezione da Citomegalovirus (HCMV) nel neonato indirizzando verso ulteriori accertamenti diagnostici in follow up (ecografia cerebrale, emocromo completo, misurazione degli enzimi epatici, esame oculistico ed esame audiometrico), per valutare il tipo di danno provocato dall'infezione ed eventualmente intraprendere precocemente un trattamento che possa prevenire o limitare i deficit legati alle complicanze tardive che incidono sulla qualità della vita. A tal fine ed è stato utilizzato un approccio di PCR real Time di tipo quantitativo applicabile a campioni di saliva e/o urine ritenuti più idonei rispetto al campione ematico, a causa di una maggiore sensibilità e specificità. Sono stati inclusi nello studio 565 bambini nati presso il Policlinico Umberto I di Roma, per i quali è stato analizzato un campione di urine raccolto entro le prime due settimane dalla nascita. Novantaquattro (16.6%) dei bambini sono risultati positivi a HCMV in base alla presenza del DNA virale nei campioni di urine. Nel caso di positività è stata eseguita la ricerca di HCMV DNA anche sul campione di sangue e/o su Guthrie card. La positività urinaria è stata confermata in 59 (62.7%) campioni ematici.

Un ulteriore aspetto preso in esame nello studio è stato l'analisi della distribuzione genotipica e filogenetica di UL73-gN in relazione alla severità dell'infezione, valutando l'eventuale associazione del genotipo riscontrato con la carica virale osservata in campioni di urine e/o sangue e con la presenza e la gravità della sintomatologia. A tal fine è stato elaborato un protocollo home made per l'analisi del genotipo gN-UL73 di HCMV (scelta dei primers, allestimento di una semi-nested PCR, corsa elettroforetica) e successivo sequenziamento (BioFab). L'analisi genomica in 24 casi di infezione congenita (15 bambini asintomatici alla nascita e 9 con almeno una delle seguenti manifestazioni cliniche: piastrinopenia, calcificazioni endocraniche, ventricolomegalia, microcefalia, atrofia cerebrale e ipoacusia) ha rivelato che tutti i 4 principali genotipi di HCMV sono stati riscontrati nei bambini infetti, ma i valori di viremia e viruria e la presenza di sintomatologia non sono inoltre risultati associati in maniera significativa alla distribuzione dei genotipi.

P2.1 - Strumenti innovativi per il monitoraggio e sorveglianza entomologica di insetti vettori

Questa linea di ricerca si proponeva di sviluppare strumenti innovativi per il monitoraggio e sorveglianza entomologica di insetti vettori di patogeni animali e zoonotici presenti sul territorio nazionale. Le ricerche sono state focalizzate sullo sviluppo di strumenti innovativi per il monitoraggio di zanzare tramite due iniziative di “citizen science”. A tal fine sono stati sperimentati due approcci:

1- Il monitoraggio “digitale” tramite ZANZAMAPP, una app per piattaforme Android e iOS (ma scaricabile anche con normale browser su computer, tramite il sito <http://web.zanzamapp.it>) sviluppata in collaborazione con lo spin-off universitario GH s.r.l. per la parte informatica e di geolocalizzazione ed il gruppo di Social Dynamics del Dipartimento di Fisica della Sapienza, che consente di raccogliere e geo-localizzare immediatamente le segnalazioni degli utenti sulla presenza/assenza di zanzare. ZANZAMAPP è stata lanciata il 4 maggio 2016 con una campagna pubblicitaria curata dall’Ufficio Stampa della Sapienza e con interviste televisive, radiofoniche e su quotidiani e settimanali. Da allora a dicembre 2017 sono state ottenute più di 34.000 segnalazioni su tutto il territorio nazionale. A questi sono stati applicati dei filtri di qualità che hanno eliminato il 14% delle segnalazioni, per un totale di 29.473 dati validati. Malgrado l’elevato numero di segnalazioni la “fedeltà” degli utilizzatori è stata modesta, con il 66% di utilizzatori che hanno inviato una sola segnalazione (spesso in corrispondenza con interviste televisive e radiofoniche) e solo il 3% che ha inviato più di 10 segnalazioni. Malgrado questo, la curva di segnalazioni negative (assenza di zanzare) e di quelle positive (presenza di almeno una zanzara) risultano coerenti con la dinamica di stagionale delle zanzare in Italia.

La validità dei dati raccolti è stata poi validata a settembre 2016 nell’isola di Procida in base al confronto fra segnalazioni ricevute tramite Zanzamapp ed i risultati di catture di *Ae. albopictus* effettuate su uomo (human landing catches). I risultati hanno dimostrato che, almeno su piccola scala, esiste una significativa correlazione tra i risultati dei due tipi di monitoraggio quando vengono considerate le segnalazioni di Zanzamapp nei tre giorni precedenti alla cattura su uomo ed in un buffer di 100 m intorno al sito di cattura (pubblicazione scientifica in preparazione).

Infine è stato sviluppato software per l’analisi delle segnalazioni di Zanzamapp che consente di produrre in tempo reale, mappe spaziali a livello locale o regionale del fastidio associato alle zanzare, che potrebbero essere convenientemente utilizzate per la pianificazione e l’ottimizzazione di strategie per la prevenzione della moltiplicazione delle zanzare.

2- Il coinvolgimento di studenti universitari (Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia e Laurea Triennale in Tecnico di Laboratorio Biomedico della Sapienza della Sapienza) nel monitoraggio tramite trappole a colla per adulti di *Ae. albopictus* a maggio-luglio 2016 e a settembre-ottobre 2017. L’analisi dei risultati ottenuti indica che: i) >80% degli studenti ha eseguito le attività previste per tutte le 10 settimane della sperimentazione; ii) l’82% delle identificazioni di zanzare (*Aedes albopictus* e *Culex pipiens*) effettuate dagli studenti sono state confermate dagli esperti del gruppo di ricerca di Entomologia Medica della Sapienza; iii) l’aumento di una zanzara/trappola/settimana corrisponde ad un aumento pari a circa il 5% del fastidio percepito. La buona performance degli studenti nelle attività di monitoraggio entomologico incoraggia a perseguire simili iniziative, che hanno come risultato collaterale la sensibilizzazione degli studenti stessi in tematiche relative all’entomologia medica.

P2.2 - Sviluppo di strumenti innovativi per la valutazione dell’esposizione umana a vettori di arbovirus.

L’obiettivo della ricerca è la messa a punto di saggi immunologici (ELISA) atti alla valutazione dell’esposizione umana a zanzare del genere *Aedes* (con particolare riferimento a *Aedes*

albopictus), vettori di arbovirus di rilevanza per la salute pubblica quali Dengue, Febbre gialla, Chikungunya e Zika, sulla base di proteine immunogeniche genere-specifiche (cioè presenti nella saliva di zanzare *Aedes* e non di altri generi di zanzare). Il progetto ha comportato innanzitutto la messa a punto di sistema sperimentale atto a studiare in condizioni controllate la risposta anticorpale ad antigeni salivari di *Ae. albopictus*. basato su un modello murino in cui gruppi di topi naïve sono stati esposti a punture di *Ae. albopictus* o *Ae. aegypti* o *Anophles gambiae* (in collaborazione con F. Severini e M. Ponzi, Istituto Superiore di Sanità). Come antigeni sono stati utilizzati (i) estratti salivari (SGE) di *Ae. albopictus*, *An. gambiae* ed *Ae. aegypti* (ii) 5 peptidi disegnati sulle proteine 34K1, 34K2 e 62K1 di *Ae. albopictus* e (iii) le proteine ricombinanti 34K2 di *Ae. albopictus* (al34K2) e 34K2 di *Ae. aegypti* (ae34K2) (fornite dal Dott. P. Gabrieli, Università di Pavia). Mediante saggi ELISA è stata misurata la risposta IgG a questi diversi antigeni con: (i) i sieri prelevati dai topi sperimentali e (ii) un siero umano iperimmune.

I risultati ottenuti mostrano che: 1. l'immunizzazione dei topi esposti ad *Ae. albopictus* e ad *Ae. aegypti* è efficace come indicato dalle risposte a SGE (poco efficace invece per *An. gambiae*); 2. I cinque peptidi testati sono dimostrati poco o per nulla immunogenici in tutte le condizioni testate; 3. le due proteine al34K2 ed ae34K2 hanno mostrato un buon grado di immunogenicità e un basso grado di cross-reattività nonostante la relativamente alta identità (63%). Nell'unico siero umano iperimmune disponibile abbiamo trovati alti livelli di IgG anti-al34K2 e la risposta era per gran parte decaduta dopo 2 anni di non-esposizione. Anche nel siero umano si è osservata la stessa bassa cross-reattività fra proteine ortologhe evidenziata nel modello murino.

In conclusione, l'immunogenicità e la specie-specificità delle due proteine testate, e il pattern temporale della risposta anticorpale osservata, rendono queste ultime due interessanti candidati che potrebbero consentire di distinguere l'esposizione alle due specie di *Aedes* anche in aree in cui queste coesistono. I candidati al34K2 ed ae34K2 saranno testati su gruppi di sieri umani raccolti in aree a bassa ed alta densità di *Ae. albopictus*, in due differenti periodi dell'anno, con minima e massima espansione delle popolazioni di zanzare per consentire di chiarire il grado di immunogenicità, la durata della risposta ed il grado di cross-reattività fra questi antigeni e consentire ulteriori passi avanti verso lo sviluppo di un saggio serologico basato su antigeni salivari per valutare l'esposizione umana ad *Ae. albopictus*.

P2.3 Quantificazione molecolare del serbatoio infettivo per la trasmissione della malaria dall'uomo al vettore.

Obiettivo di questa linea di ricerca è stato quello sviluppare saggi qRT-PCR sensibili e a basso costo per studi epidemiologici su larga scala, basati sulla quantificazione dei trascritti gametocita-specifici di *Plasmodium falciparum*. La quantificazione del serbatoio totale di gametociti è necessaria per ottenere un'informazione completa sulla capacità infettante dell'uomo verso il vettore, mentre la quantificazione differenziale di gametociti femminili e maschili è necessaria per la determinazione del sex-ratio, importante per il completamento del ciclo del parassita all'interno del vettore, due aspetti fondamentali per valutare il rischio di trasmissione della malattia.

Sono stati quindi messi a punto dei saggi Real Time PCR (SybrGreen) basati su marcatori gametocita specifici sono stati scelti sulla base dei risultati di studi di trascrittomica e proteomica presenti in letteratura: Pfs25 (ookinete surface antigen precursor) e GK (glycerolkinase), espressi prevalentemente nei gametociti femminili, e P230p (6-cysteine protein) e Pf13 (meiosis-specific nuclear structural protein 1), espressi prevalentemente in quelli maschili. I saggi sono stati sviluppati e testati su un sottocampione di 50 persone e dei risultati quantitativi (copie/mcl) ottenuti per i diversi marcatori sesso-specifici attraverso amplificazione di cDNA preparato da purificazioni a concentrazione nota di gametociti maschili e femminili di *P. falciparum* sono stati utilizzati per

costruire una curva di correlazione tra numero di copie di trascritto e numero di gametociti maschili e femminili. I saggi molecolari basati sull'amplificazione della coppia di marcatori pfs25 (femminile) e pf13 (maschile) sono risultati altamente sensibili e specifici, e più sensibili rispetto alle altre combinazioni di marcatori maschili e femminili. I risultati sono stati pubblicati in: Santolamazza et al. (2017) Detection of *Plasmodium falciparum* male and female gametocytes and determination of parasite sex ratio in human endemic populations by novel, cheap and robust RTqPCR assays. *Malar J* 16(1):468. doi: 10.1186/s12936-017-2118-z.

P2.4 - Valutazione del rischio di allergie nell'uomo da parassiti zoonotici nei prodotti ittici

Per valutare il rischio di allergie nell'uomo da parassiti zoonotici nei prodotti ittici sono stati svolti due ricerche con particolare riferimento alla specie zoonotica *Anisakis pegreffii*, il parassita più diffuso tra le specie ittiche di interesse commerciale pescate nei mari italiani:

1- Valutazione nell'uomo dell'ipersensibilità-IgE specifica vs *Anisakis pegreffii*: è stata valutata, per la prima volta, la risposta anticorpale IgE dell'uomo mediante immunoblotting (IgE-WB) contro antigeni escretori-secretori (ES) ottenuti da colture *in vitro* e da estratto crudo (CE) di *Anisakis pegreffii*, confrontando i dati ottenuti con quelli ottenuti mediante l'approccio generalmente usato per diagnosticare l'allergia da *Anisakis* (ImmunoCAP: iCAP), con quelli osservati all'analisi immunoblotting (IgE-WB). Sono stati analizzati 110 sieri provenienti da: i) pazienti con anisakiasi gastro-allergica e reperto parassitario (GAA); ii) pazienti con sintomi allergici (orticaria, edema delle mucose) dopo consumo di pesce crudo (CU+); e iii) controlli negativi. I risultati indicano che la positività di iCAP con valori superiori a $\geq 0,35 \text{ kU}_a/\text{L}$ dovrebbe essere sempre valutata in un algoritmo diagnostico, mediante analisi "di conferma" basata su WB-IgE, o ELISA con l'utilizzo di antigeni ES. I risultati di questo obiettivo sono stati pubblicati in: Mattiucci et al. 2017 IgE sensitization to *Anisakis pegreffii* in Italy: comparison of two methods for the diagnosis of allergicanisakiasis. *Parasite Immunology* 2017. doi:10.1111/pim.12440.

2- Analisi degli antigeni considerati "major allergens" nella specie zoonotica *A. pegreffii*: si è proceduto al sequenziamento del cDNA di proteine antigeniche, tra quelle considerate come "major allergens" di *A. pegreffii* ed alla stima dei trascritti di proteine antigeniche (allergeni) in larve mantenute a differenti condizioni di temperatura, e tempo. Lo studio ha evidenziato che i livelli di espressione di *A. peg-1* e *A. peg-13*, proteine presenti nel secretoma di larve di *A. pegreffii* e considerate come "major allergens", sono sensibili alla variazione di temperatura. Ciò fa quindi pensare che queste proteine abbiano un ruolo nella tolleranza del parassita a stress termici, e che modulino sia la risposta adattativa del parassita ai diversi microhabitat, che la risposta immunitaria da parte di diversi ospiti (naturali ed accidentali). Inoltre, il livello di trascrizione di alcune proteine antigeniche potrebbe essere usato come un "biomarcatore", dell'infettività da parte di larve di *A. pegreffii*, sia in ospiti eterotermi naturali (pesci) che omeotermi accidentali (Uomo). Risultati in corso di pubblicazione.

I2.1 - Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni ospedalieri di provenienza sia ambientale che clinica da utilizzarsi in protocolli di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all'assistenza nei reparti a più elevato rischio di infezione

È stato messo a punto un protocollo di sorveglianza e controllo delle infezioni nosocomiali da validare, condividere ed esportare nelle strutture considerate ad alto rischio, incentrato su pazienti e microrganismi di isolamento clinico ed ambientale, la cui identificazione e genotipizzazione consentirà il riconoscimento di cluster epidemici, con i seguenti obiettivi specifici: 1) ottenere dati attendibili sull'incidenza delle infezioni nosocomiali; 2) raccogliere dati sull'incidenza e circolazione

dei microrganismi MDR e monitorare l'utilizzo degli antibiotici, in modo da studiare l'eventuale correlazione tra pressione selettiva degli antibiotici e diffusione di microrganismi resistenti; 3) genotipizzare i microrganismi responsabili di infezione al fine di stabilire eventuali correlazioni clonali e di quantificare, in tale modo, l'entità delle infezioni crociate.

I tre obiettivi sono stati raggiunti attraverso la messa a punto ed esecuzione, ogni 15 gg, di prelievi, su superfici critiche, di microrganismi eventualmente presenti, di cui sono stati tracciati i profili di antibiotico-resistenza. In totale sono stati raccolti ed analizzati 530 campioni da superfici (bordo letto, carrello farmaci, monitor, tastiera pc, piano emogas, rubinetto lavabo) selezionate per prossimità al paziente, tenendo in considerazione la frequenza di utilizzo da parte del personale, il rischio di contaminazione e la difficile decontaminazione. In particolare, 142 campioni sono risultati positivi per rinvenimento di microrganismi di interesse clinico: *Acinetobacter baumannii* rinvenuto in 43 campioni; a seguire *Enterococcus faecalis/faecium* e *Staphylococcus aureus* in 20 campioni e *Klebsiella pneumoniae* in 10 campioni. Le superfici maggiormente coinvolte in termini assoluti sono risultate: il monitor ventilator (26 positivi), il bordo letto (24 positivi), il carrello dei farmaci (14 positivi), la tastiera del pc, il mouse (13) ed l'emogas (8). I ceppi isolati ed identificati hanno costituito una ceppoteca al fine di disporre anche di una mappatura della loro eventuale antibiotico-resistenza.

Sono stati messi a punto protocolli per la genotipizzazione molecolare, mediante tecnica PFGE, di ceppi di *A. baumannii* e di *K. pneumoniae*. Tale metodica prevede una digestione enzimatica dell'intero DNA genomico con enzimi di restrizione che effettuano pochi tagli ("rare cutting restriction enzyme"), in modo da generare un numero di frammenti variabili (8-25) di diverse dimensioni (tra 40 e 600 kb) che vengono separati mediante l'utilizzo di un sistema elettroforetico a campo pulsato, in cui l'orientamento del campo elettrico viene periodicamente cambiato al fine di ottenere una migliore separazione dei frammenti. Le prime analisi hanno riguardato *A. baumannii* poiché risulta essere il microrganismo maggiormente coinvolto nelle ICA e poiché all'interno del reparto si stava verificando un aumento della frequenza di riscontro di ceppi dotati di un'elevata antibiotico-resistenza e di resistenza ai biocidi. Attualmente sono stati genotipizzati 204 ceppi di *A. baumannii* di cui 162 di matrice clinica e 42 di matrice ambientale. A seguire, è stato convalidato il protocollo di genotipizzazione di 19 ceppi di *K. pneumoniae* di cui 18 di matrice clinica e 1 di matrice ambientale. Per quanto riguarda *A. baumannii*, l'analisi del pulsotipo ha evidenziato una diffusione di un clone prevalente, il clone B, sia tra i ceppi di isolamento clinico (80 più 27 sottocloni) che ambientale (14 più 8 sottocloni) diffusi in tutto il reparto e per tutto il periodo di osservazione. A seguire abbiamo evidenziato un pulsotipo A con 21 cloni di isolamento clinico e 14 di isolamento ambientale più frequente all'inizio del periodo di osservazione. Altri cloni C-D-E ed F sono stati rinvenuti nel corso del periodo di osservazione in alcuni pazienti, che, tuttavia, non hanno comportato diffusione a livello ambientale e sono rimasti circoscritti ad un paziente.

I2.2 Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni alimentari di provenienza sia alimentare sia clinica da utilizzarsi nel processo di rapid risk assessment a livello dei punti di ingresso frontalieri

L'obiettivo della linea di ricerca è la messa a punto di un modello di comunicazione dei risultati della sorveglianza di laboratorio su microrganismi ricorrenti in notifiche di MAT e in attivazione del RASFF la cui rapida identificazione, caratterizzazione genotipica e comunicazione sarà di supporto al Rapid Risk Assessment a livello dei Punti di ingresso frontalieri della Regione Lazio. Inizialmente è stata eseguita una revisione sistematica della letteratura e successivamente si è proceduto ad organizzare un'analisi delle categorie alimentari e dei pericoli microbiologici più frequentemente coinvolti *in alert* nel nostro Paese.

Dal 2014 a luglio 2016 le notifiche italiane riportate dal RASFF Portal per microrganismi patogeni sono risultate complessivamente 249 (75 alert; 46 borderrejection; 128 information) ed i microrganismi patogeni maggiormente coinvolti sono stati: *Salmonella* spp (n.68), *Listeria monocytogenes* (n.52) ed *E. coli* tossigenici (n.31), mentre le categorie alimentari maggiormente coinvolte nelle notifiche provenienti dall'Italia sono risultate essere molluschi bivalvi e pesce (57% delle notifiche), carne e pollame (27%), latte e derivati (3%) e 0% per frutta e ortaggi.

Per la tipizzazione sierologica e molecolare di ceppi di *L. monocytogenes*, è stata applicata la metodica di tipizzazione utilizzata nei Punti di Ispezione frontaliere di Lazio e Toscana. I risultati della siero agglutinazione in 64 ceppi selezionati hanno evidenziato la prevalenza di uno specifico sierotipo. L'analisi comparativa ha evidenziato l'esistenza di 17 cloni. Da sottolineare che 40/64 ceppi (62,5%) proveniva da uno stesso Operatore del Settore Alimentare (OSA) della Romania che confeziona prodotti della pesca. In prodotti afferenti a questo OSA sono stati individuati 10 cloni differenti. Inoltre, è emerso che un clone di *L. monocytogenes* ha circolato in diversi paesi dell'Unione Europea, da aprile 2015 ad agosto 2017, soprattutto nel Salmone di origine Norvegese affumicato e confezionato da OSA nella Spagna, Norvegia e Romania.

Infine, è stato messo a punto un modello di formazione/addestramento a supporto della gestione delle emergenze delle Malattie a Trasmissione Alimentare di origine batterica, progettato in collaborazione con il Ministero della Salute Dipartimento Sanità animale e farmaco e l'ISS sia a Discenti iscritti a un corso di formazione post laurea dell'Università di Roma La Sapienza finalizzato alla formazione in tema di sicurezza alimentare e a Discenti frequentanti il Corso di Laurea Specialistica in Scienze delle Professioni Sanitarie della Prevenzione dell'Università di Roma La Sapienza.

LINEA 3 - IMPLEMENTAZIONE DI TECNOLOGIE INNOVATIVE DI INTERESSE IN SANITÀ PUBBLICA

M3.1 - Le onde acustiche nei processi di sterilizzazione

Questa linea di ricerca si proponeva di valutare se le onde acustiche possano rappresentare un metodo fisico innovativo ed economico, di facile gestione, non invasivo e privo di effetti collaterali, nei processi di sterilizzazione. L'ipotesi di lavoro era che onde acustiche a bassa energia oppure cavitanti avrebbero dovuto produrre effetti diversi sui batteri adesi ed in biofilm a supporti abiotici quali la morte, l'inibizione della formazione del biofilm o la disaggregazione del biofilm preformato. Dati ottenuti prima dell'inizio del progetto (ma dopo la presentazione dello stesso per il finanziamento) hanno mostrato l'inefficacia di questo processo soprattutto nella disaggregazione del biofilm e dati erratici nell'effetto inibente la formazione del biofilm. Pertanto questa attività non è stata proseguita.

P3.1 - Ottimizzazione dei protocolli per la valutazione dell'efficacia di strategie di lotta contro specie italiane di zanzare e la rilevazione di resistenza agli insetticidi.

Sono stati innanzitutto messi a punto e ottimizzati protocolli per la valutazione dell'efficacia di insetticidi per il controllo di zanzare seguendo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. E' stato quindi iniziato uno screening della suscettibilità ai piretroidi di popolazioni europee di zanzare in collaborazioni con vari istituzioni nazionali ed internazionali. I risultati evidenziano una presenza diffusa di resistenza a piretroidi in *Cx pipiens* e, per la prima volta in Europa, una ridotta suscettibilità di alcune popolazioni di *Ae. albopictus* raccolte in Emilia Romagna nel 2016 e

ad Anzio nel 2017, dopo i trattamenti adulticidi effettuati per limitare l'epidemia del virus chikungunya che ha causato centinaia di casi umani nel Lazio, con epicentro proprio ad Anzio. Sebbene la maggior parte delle popolazioni analizzate di *Ae. albopictus* siano comunque risultate completamente suscettibili ai piretroidi testati, questi risultati rappresentano un campanello d'allarme poiché indicano l'inizio della diffusione di resistenza contro gli unici autorizzati in Europa per colpire gli insetti adulti e contenere eventuali epidemie di arbovirus esotici (es. chikungunya, dengue e zika). Risultati pubblicati in Pichler et al. (2017) First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian *Aedes albopictus* populations 26 years after invasion. *Pest Management Science*. doi: 10.1002/ps.484

Sono stati anche messi a punto e ottimizzati protocolli per la valutazione dell'efficacia di sostanze repellenti. Sebbene siano largamente utilizzati per ridurre il fastidio dalle punture di insetto, i repellenti più diffusi in commercio sono stati raramente testati per comprovare il reale effetto nei confronti di popolazioni naturali della zanzara tigre *Ae. albopictus*. Anche in questo caso adattati protocolli dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Inizialmente i bio-saggi sono stati testati per valutare l'effettiva repellenza di nuove molecole potenzialmente repellenti fornite da Società private rispetto ai due prodotti più largamente utilizzati in commercio (il Deet e l'Icaridina). I risultati hanno evidenziato una repellenza delle molecole testate uguale o inferiore a quella dei prodotti commerciali di riferimento.

P3.2 Applicazione di biosaggi per la valutazione di semiochimici repellenti/attrattivi per insetti ematofagi.

Obiettivo di questa linea di ricerca è valutare se le variazioni individuali nella composizione del microbiota della pelle, in termini di numerosità e variabilità di specie, possano influenzare la diversa attrattività individuale nei confronti *Ae. albopictus*. Il disegno sperimentale implicava la raccolta di microbiota da individui con diversa attrattività nei confronti delle zanzare, la caratterizzazione genomica del microbiota individuale e la parallela valutazione dell'attrattività tramite un metodo oggettivo rappresentato dal tunnel del vento. Ritardi nella concessione dell'autorizzazione da parte del comitato etico hanno ritardato questa linea di ricerca, che verrà portata avanti dopo la fine del progetto, grazie alla collezione del microbiota da gestanti del reparto di Ostetricia del Policlinico Umberto I, ottenuta negli ultimi mesi. Ci si è infatti concentrati su questo gruppo di ospiti, per valutare oltre l'attrattività individuale anche l'eventuale effetto della gravidanza sul microbiota e sull'attrattività. La ricaduta applicativa del lavoro essere l'individuazione di specifiche componenti microbiche con attività attrattive o repulsive utili per la messa a punto di prodotti biologici che funzionino da attrattivi o repellenti nei confronti di *Ae. albopictus* (analogamente da quanto fatto da altri gruppi di ricerca per zanzare tropicali vettori di malaria).

LINEA 4 - METODOLOGIE STATISTICHE PER LA GESTIONE E ELABORAZIONE DATI IN SANITÀ PUBBLICA

Nell'ambito di questa linea di ricerca è stato fornito supporto alla valutazione statistica di nuove metodologie diagnostiche e di sanità pubblica, e di valutazione del rischio di agenti patogeni e contaminanti ambientali. Inoltre, è stata svolta la seguente ricerca.

S1 – Nuovi strumenti per la valutazione di test prognostici tempo-dipendenti dal tempo.

I test diagnostici e i test prognostici sono degli strumenti il cui obiettivo è la classificazione dei pazienti in due classi disgiunte: un test diagnostico fornisce una diagnosi (positiva/negativa) sulla presenza o meno di una determinata malattia; un test prognostico, invece, fornisce una stima della probabilità che un paziente ha di sviluppare la malattia o di andare incontro ad un certo evento di interesse (morte, ricaduta, etc) entro un prefissato arco di tempo e quindi classifica i pazienti in base a tale probabilità. I test prognostici hanno quindi come scopo quello di effettuare previsioni rispetto al decorso della malattia. Negli ultimi anni, la ricerca scientifica sta impiegando numerose risorse per trovare nuovi biomarcatori in grado di classificare in modo sempre più accurato i pazienti in diversi gruppi prognostici per migliorare l'accuratezza delle previsioni dei risultati aiutando quindi il medico a prendere decisioni terapeutiche migliori. La valutazione delle performance prognostiche relative ai biomarcatori ha assunto quindi un ruolo sempre più importante richiedendo metodi statistici sempre più avanzati. Inoltre, strategie multimarker, fondate sulle prove (o sulle ipotesi), aumentano il potere predittivo a causa dell'uso combinato di indicatori biologici.

L'obiettivo del progetto era quello di valutare l'accuratezza prognostica relativa ad un biomarcatore tempo-dipendente, osservato in diversi istanti temporali pre-specificati. In particolare, sono state riformulate le definizioni dei principali strumenti per la valutazione della bontà di un test prognostico: sensibilità, specificità, curve ROC e *net reclassification index* (NRI) per biomarcatori tempo dipendenti ovvero misurati in diversi istanti temporali pre-specificati. I contributi metodologici sono evidenziati sia attraverso uno studio di simulazione che mediante un'applicazione a dati reali relativa a pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa. Nello specifico, per quanto riguarda l'analisi dei dati reali, il fine era quello di valutare se misurazioni ripetute della disfunzione ventricolare destra potessero aumentare le capacità prognostiche relative ad un evento cardiaco (mortalità/trapianto di cuore urgente). Sfruttando le informazioni relative alla traiettoria del nuovo biomarker (disfunzione ventricolare destra SI/NO) si ha una maggiore accuratezza nella classificazione del rischio e l'ipotesi dell'utilità di un biomarcatore prognostico, rilevato in più tempi, è stata confermata dal fatto che la capacità di prognosi migliora anche in contesti in cui il numero di eventi considerati è piuttosto elevato.

2. ATTIVAZIONE E COINVOLGIMENTO DELLE IMPRESE LAZIALI, GRADO DI SODDISFAZIONE DELLA DOMANDA, RICADUTE INDUSTRIALI ATTUALI E POTENZIALI

-Il metodo innovativo denominato BioTimer Assay ha destato molto interesse soprattutto nei clinici che devono intervenire in tempi rapidi quando le infezioni delle protesi o dei device medici sono associate a batteri in biofilm. Non esistono attualmente metodiche analitiche innovative che permettano di diagnosticare in tempi rapidi suddette infezioni, difficili da eradicare, fornendo delle risposte analitiche fondamentali per la guarigione del paziente. I promettenti dati sperimentali ottenuti hanno costituito la base per un possibile interesse da parte di Ditte interessate alle analisi chimico-cliniche-microbiologiche ed alle analisi sui controlli di qualità di nano particelle, quali URAGME e NANOSHARE – Società specializzata in Sviluppo di nuovi prodotti e metodologie nel campo delle micro e nanotecnologie.

-Il metodo della sonicazione abbinato al classico metodo di Cleri ha stimolato l'interesse di Ditte di Elettromedicali produttrici di Sonicatori, quale SONOSFERA ITALIA s.r.l.

-Il protocollo innovativo per l'enumerazione di particelle virali basato su alcune modifiche applicate al Metodo Odissey ha suscitato interesse nei ricercatori coinvolti nelle diagnosi di infezioni virali

-Il protocollo di qPCR per la ricerca di *Babesiadivergens* in emoderivati è stato proposto alla GENESIG s.r.l.– un'azienda del gruppo Primerdesign, che occupa delle realizzazione e validazione di sonde e protocolli per il rilevamento di patogeni in RealTime PCR. - con la quale in corso la progettazione di altri protocolli per la detection di altre specie di Babesia zoonotiche, quali ad esempio *B. microti*. Al momento sono stati forniti all'azienda controlli positivi per le due specie di parassiti provenienti da colture di eritrociti infetti.

- E' in corso con FGM s.r.l. –una società che produce kit sierologici per la diagnosi di parassiti – la valutazione del possibile sviluppo di un RDT di nuova generazione basato sull'antigene di 37KDa per la diagnosi diretta di *Babesia divergens* mediante un tool rapido, di facile utilizzo anche in condizioni di campo. Allo stato attuale, è stata approvata una convezione ufficiale tra la FGM e il DSPMI e la FGM sta valutando i costi per la realizzazione del test.

-E' stata attivata una collaborazione con GENERON s.r.l. - un'azienda di produzione e commercializzazione di prodotti per la ricerca di contaminanti negli alimenti. Nello specifico, la collaborazione ha previsto da parte del DSPMI la fornitura di materiale di riferimento per lo sviluppo di un kit real-time PCR per lo screening di DNA di nematodi anisakidi in matrici alimentari e prodotti della pesca, la validazione della procedura secondo accreditamento e una fase di formazione del personale aziendale.

-E' stato firmato un contratto di ricerca tra il DSPMI e la Società EFFEGIEMME s.r.l. - una società italiana di diagnostici specializzata nella ricerca e distribuzione di prodotti diagnostici e punto di riferimento nei settori della parassitologia e della microbiologia italiana -per l'implementazione di metodiche di screening di prodotti ittici per la ricerca di nematodi zoonotici.

-Sono in corso di definizione collaborazioni con aziende produttrici per la validazione di un test rapido per HCMV da utilizzare per lo screening dell'infezione di Citomegalovirus (HCMV) da campioni di saliva e/o urine.

-E' stata stabilito un forte legame tra il DSPMI e l'ANID - Associazione di Imprenditori della Disinfestazione – al fine di creare attività di formazione congiunta per dirigenti e operatori nel campo della disinfestazione di zanzare nel Lazio ed in Italia operare un trasferimento tecnologico nel campo della pianificazione e valutazione degli interventi di controllo.

3. INNOVAZIONI/AVANZAMENTI TECNOLOGICI PRODOTTI DAL PROGRAMMA IN RELAZIONE ALLO STATO DELL'ARTE

METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA DIAGNOSI DI PATOGENI

1- La metodica tradizionale di Cleri per la conta di microorganismi adesi in biofilm presenta diversi limiti, in quanto richiede un pre-trattamento del campione, non fornisce alcuna certezza sul distacco dei batteri adesi in biofilm ed impiega tempi relativamente lunghi. Nell'ambito del progetto sono stati ottimizzati, validati e comparati due approcci innovativi per la **conta di microorganismi adesi in biofilm in dispositivi intracardiaci impiantabili e intravascolari**, il BioTimerAssay (BTA) e della tecnica di vortex-sonicazione-vortex (VSVM) che consentono di aumentare la sensibilità diagnostica nel caso di infezioni associate a biofilm. I risultati ottenuti hanno dimostrato: i) un'elevata concordanza tra i due metodi; ii) necessità di tempi inferiori per ottenere le risposte analitiche sul numero dei batteri adesi mediante BTA rispetto a SVSM; iii) possibilità diagnosi a livello di genere e specie batterica solo con SVSM; iv) possibilità di contemporanea analisi di batteri colonizzanti diversi segmenti degli elettrodi tramite BTA, che può essere quindi utilizzato per comprendere la patogenesi dell'infezione di un dispositivo cardiaco. In conclusione, l'utilizzo del BTA e del VSVM nella pratica clinica/diagnostica consentirebbe la veloce conta dei batteri adesi su dispositivi intracardiaci impiantabili e intravascolari e di definire con precisione il genere e la specie del batterio/i adeso/i. Inoltre, le analisi dei diversi segmenti degli elettrodi potrebbero servire come strumento aggiuntivo per una migliore comprensione della patogenesi dell'infezione del dispositivo cardiaco.

2-Le metodiche molecolari ("in Cell Western"; ICW) messe a punto per la **titolazione di virus a DNA ed a RNAe per la quantizzazione di batteri intracellulari** tramite la strumentazione "OdysseyCLx imaging System" hanno prodotto risultati ottenuti confrontabili con i risultati ottenuti mediante metodi tradizionali (Western Blot e chemiluminescenza,) sia dal punto di vista della titolazione virale che della quantizzazione di batteri intracellulari. Inoltre, la strumentazione Odyssey ha permesso di valutare l'espressione di proteine virali e cellulari anche a distanza di 24/48 ore dalla colorazione con gli anticorpi specifici grazie ad una maggiore stabilità e durata nel tempo del segnale, e di evidenziare contemporaneamente proteine diverse con diversi anticorpi secondari, riducendo così i tempi di esposizione e di acquisizione dei risultati.

3-Il saggio TaqMan basato sul gene delle Beta-tubulina strutturale degli Apicomplexa ed ha mostrato una buona efficienza di amplificazione e un'elevata specificità per le diverse specie di Babesia, e potrebbe essere efficacemente utilizzato sia per la **routine diagnostica sia per la ricerca di Babesia divergens in emoderivati**.

4-L'antigene di 37KDa di *Babesia divergens* ha mostrato alta specificità e sensibilità, ed è idoneo ed essere considerato candidato per lo sviluppo di kit immunologici (ELISA, WB, RDT) per la **diagnosi di B. divergens nell'uomo e negli animali**.

5-La **caratterizzazione genetica di esemplari di trasmissione di elmintosi a trasmissione zoonotica** ha evidenziato la necessità di strumenti molecolari sofisticati per la corretta identificazione dei patogeni, e la necessità di integrare informazioni da più loci genetici per avere un quadro epidemiologico attendibile, e ha fornito utili informazioni per lo sviluppo di modelli predittivi di rischio e di diffusione di *Echinococcus* spp e *Ascaris* spp. I protocolli molecolari testati potranno essere utilizzati per lo screening di categorie di lavoratori (ad es. pastori, addetti alla macellazione, allevatori, agricoltori, macellai, veterinari, conciatori) per valutare il rischio occupazionale delle parassitosi in oggetto.

6- La metodica RT-PCR-DNA Multiplex con primers/sonde specie-specifiche, può essere utilizzata per **identificare a livello di specie un gran numero di esemplari di nematodi zoonotici nei prodotti ittici con un'unica reazione**, riducendo sia tempi che costi, rispetto al metodo classico di amplificazione e sequenziamento. La metodica può essere utilizzata in ambito di controlli ispettivi, per la valutazione della qualità e salubrità del prodotto ittico, e nei processi industriali di trasformazione in "sea-food" del prodotto ittico pescato. Alcuni beta-testing utilizzando queste metodiche sono stati eseguiti su tessuti ittici infestati da larve della specie *A. pegreffii* ed *A. simplex* s.s. da Industrie di trasformazione del prodotto ittico. Inoltre, lo stesso sistema primers/sonde specie-specifiche, ha trovato applicazione anche nella diagnostica molecolare dell'anisakiasi umana, permettendo l'identificazione a livello di specie dell'agente eziologico, a partire da biopsie tissutali e singole sezioni istologiche (o anche inclusioni in paraffina), di granulomi asportati chirurgicamente in casi di anisakiasi gastrica ed intestinale

METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI PATOGENI E DA CONTAMINANTI AMBIENTALI

1. Il **protocollo di PCR real Time di tipo quantitativo per la diagnosi di infezione da Citomegalovirus (HCMV) da campioni di saliva e/o urine** è innovativo e presenta diversi vantaggi rispetto ai protocolli tradizionali: i) è automatizzato e rapido; ii) è altamente sensibile e specifico; iii) consente il tempestivo riconoscimento dell'infezione da nel neonato indirizzando verso ulteriori accertamenti diagnostici in follow up (ecografia cerebrale, emocromo completo, misurazione degli enzimi epatici, esame oculistico ed esame audiometrico), per valutare il tipo di danno provocato dall'infezione ed eventualmente intraprendere precocemente un trattamento che possa prevenire o limitare i deficit legati alle complicanze tardive che incidono sulla qualità della vita. Il protocollo quindi dovrebbe essere utilizzato in schemi di screening "mirato" rivolto ai bambini a rischio e a coloro che risultano positivi allo screening audiologico neonatale incluso dal 2017 nei LEA (che dovrebbe attualmente riguardare circa il 96% dei nati), oggi resi impossibili dall'assenza di un test affidabile e applicabile su vasta scala. Il protocollo è oggi impiegato da i Reparti di Clinica Ostetrica e Neonatologia del Policlinico Umberto I di Roma, per il controllo e la gestione dell'infezione congenita da Citomegalovirus.

2- **Gli strumenti per il monitoraggio di zanzare tramite "citizen science"**, ed in particolare il monitoraggio digitale tramite ZANZAMAPP, hanno la potenzialità (se l'uso viene opportunamente "promosso") di produrre in tempo reale, mappe spaziali a livello locale o regionale del fastidio associato alle zanzare, che potrebbero essere convenientemente utilizzate per la pianificazione e l'ottimizzazione di strategie per la prevenzione della moltiplicazione delle zanzare. Sono pianificate per l'estate 2018 collaborazioni in tal senso con i Comuni di Latina e Ventotene, mentre la proposta è ancora al vaglio da parte di altri Comuni. L'altro vantaggio del monitoraggio via ZanzaMapp è la possibilità di essere svolto su larga scala (ad es. a livello nazionale) consentendo una panoramica generale non ottenibile con dati di monitoraggio entomologico, che comunque potrebbero complementare i dati di ZanzaMapp in aree evidenziate come "critiche". Grazie ai risultati ottenuti con ZanzaMapp, il gruppo di ricerca è stato incluso in un network europeo voluto dalle Nazioni Unite per lo sviluppo di un sistema per il monitoraggio delle zanzare a livello globale tramite applicazioni per smartphones (Global Mosquito Alert) con il coinvolgimento della European Citizen Science Association.

3-I saggi immunologici (ELISA) per la **valutazione dell'esposizione umana a punture di *Ae. Albopictus*** a sulla base di proteine immunogeniche genere-specifiche devono essere ancora validati al fine consentire di chiarire il grado di immunogenicità, la durata della risposta ed il grado di cross-reattività fra questi antigeni. Rispetto alle misure entomologiche classiche attualmente impiegate, un saggio serologico basato su antigeni salivari sarà in grado di fornire indicazioni dirette sul contatto uomo-vettore, sia al livello individuale che di popolazione e di effettuare screening, anche su larga scala, a costi contenuti ed eventualmente in parallelo ad altri test sierologici (per es. per la ricerca di anticorpi anti-arbovirali). Da questo punto di vista si tratta di uno strumento di rilevanza per le autorità di salute pubblica, specie in caso di epidemie, quando una rapida valutazione del rischio è necessaria per l'implementazione di contromisure strategiche.

4-I saggi qRT-PCR sviluppati nell'ambito del progetto per la **diagnosi di malaria da *Plasmodium falciparum***- attualmente basa su tecniche di microscopia classica o immunocromatografiche (rapid diagnostic test) -sono risultati essere altamente sensibili e a basso costo, e potrebbero essere utilizzati su larga scala anche per la stima della sex ratio dei gametociti eventualmente presenti nei campioni di campo quale strumento di valutazione per il rischio di trasmissione della malattia.

5-Il saggio immunoblotting (IgE-WB) sviluppato contro antigeni escretori-secretori (ES) **ottenuti da colture *in vitro* e da estratto crudo (CE) di *Anisakis pegreffii*, consente la diagnosi e la valutazione nell'uomo dell'ipersensibilità-IgE specifica da *Anisakis pegreffii***. Attualmente il saggio viene utilizzato dalla UOS "Diagnosi Parassitologica", dell'Azienda Universitaria Policlinico Umberto I e potrà essere quindi adottato da altri organi competenti (ASL regionali, aziende ospedaliere della regione Lazio).

7- E' stato sviluppato **un protocollo di sorveglianza delle infezioni nosocomiali** che consente il rapido riconoscimento di cluster epidemici e la genotipizzazione di microrganismi responsabili di infezione.

8. E' stato sviluppato **un protocollo per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni alimentari di provenienza sia alimentare sia clinica** da utilizzarsi nel processo di Rapid Risk Assessment a livello dei Punti di ingresso frontaliere della Regione Lazio.

8. E' stato messo a punto **un modello di formazione/addestramento a supporto della gestione delle emergenze delle Malattie a Trasmissione Alimentare di origine batterica**, progettato in collaborazione con il Ministero della Salute Dipartimento Sanità animale e farmaco e l'ISS sia a Discenti iscritti a un corso di formazione post laurea dell'Università di Roma La Sapienza finalizzato alla formazione in tema di sicurezza alimentare e a Discenti frequentanti il Corso di Laurea Specialistica in Scienze delle Professioni Sanitarie della Prevenzione dell'Università di Roma La Sapienza.

IMPLEMENTAZIONE DI TECNOLOGIE INNOVATIVE DI INTERESSE IN SANITÀ PUBBLICA

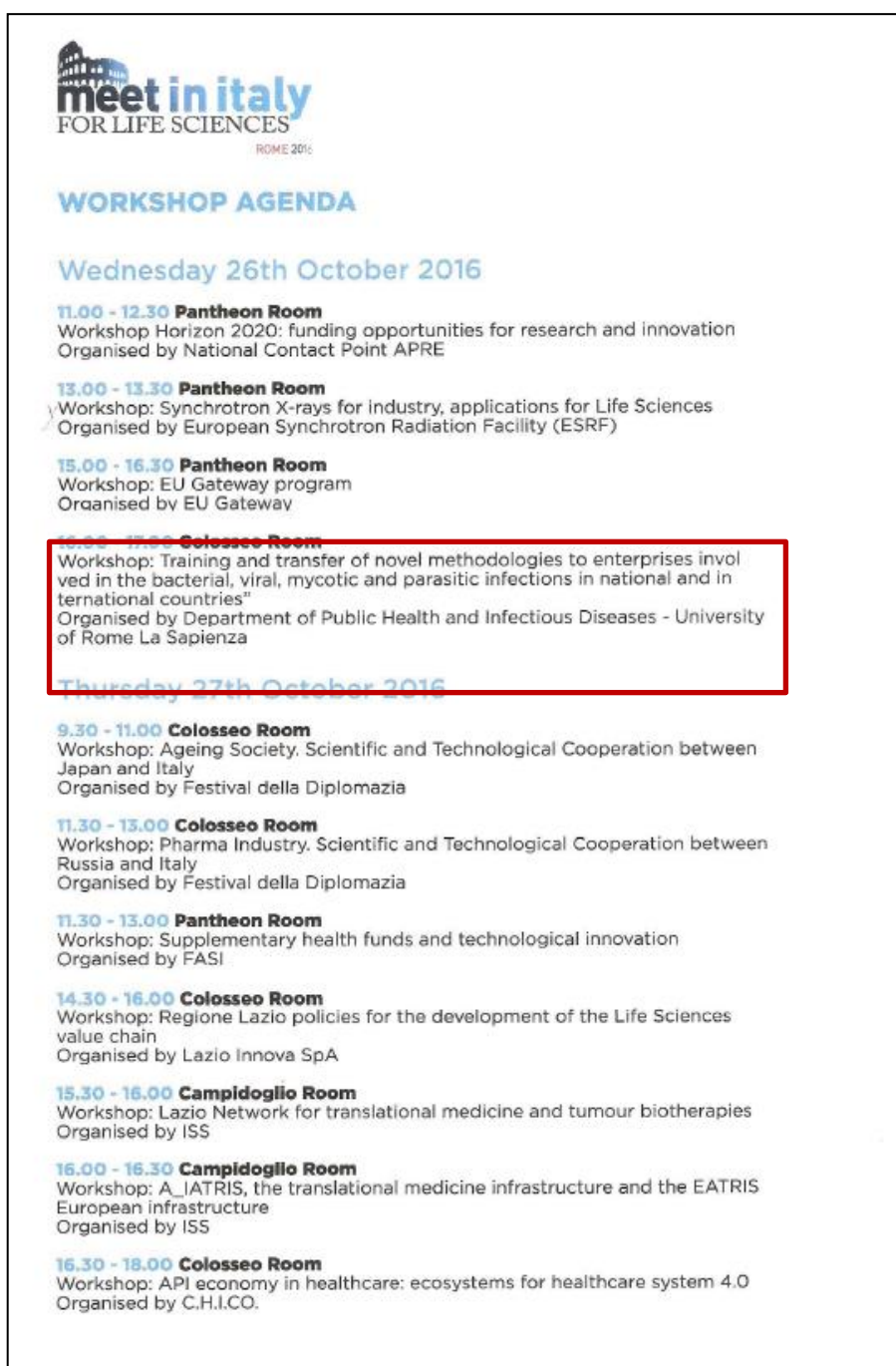
1- Sono stati messi a punto e ottimizzati **protocolli per la valutazione dell'efficacia di prodotti insetticidi e repellenti per zanzare** che richiedono allevamenti di Culicidi target, strumentazione

specifica (es. tunnel del vento), celle climatizzate e esperienza e sono oggi a disposizione di ditte private per la valutazione dell'efficacia di nuove molecole e di amministrazioni pubbliche per la valutazione dell'insorgenza e diffusione della resistenza agli insetticidi.

2. E' stato messo a punto un **approccio statistico avanzato per la valutazione delle performance prognostiche relative a strategie che utilizzano più biomarcatori tempo-dipendenti** per aumentare il potere predittivo a causa dell'uso combinato di indicatori biologici.

4. DIFFUSIONE DEI RISULTATI DEL PROGRAMMA

-26 ottobre 2016: la coordinatrice del progetto, Prof.ssa Pierdaniela Valenti, ha organizzato un workshop dal titolo "Training and transfer of novel methodologies to enterprises involved in bacterial, viral, mycotic and parasitic infections in national and international countries" nell'ambito del convegno MEET IN ITALY FOR LIFE SCIENCES: BOOST YOUR BUSINESS, PARTNERING AND NETWORKING OPPORTUNITIES" patrocinato tra gli altri dalla Regione Lazio, Lazio Innova e BicLazio.



meet in italy
FOR LIFE SCIENCES
ROME 2016

WORKSHOP AGENDA

Wednesday 26th October 2016

11.00 - 12.30 Pantheon Room
Workshop Horizon 2020: funding opportunities for research and innovation
Organised by National Contact Point APRE

13.00 - 13.30 Pantheon Room
Workshop: Synchrotron X-rays for industry, applications for Life Sciences
Organised by European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)

15.00 - 16.30 Pantheon Room
Workshop: EU Gateway program
Organised by EU Gateway

12.30 - 13.30 Colosseo Room
Workshop: Training and transfer of novel methodologies to enterprises involved in the bacterial, viral, mycotic and parasitic infections in national and international countries
Organised by Department of Public Health and Infectious Diseases - University of Rome La Sapienza

Thursday 27th October 2016

9.30 - 11.00 Colosseo Room
Workshop: Ageing Society. Scientific and Technological Cooperation between Japan and Italy
Organised by Festival della Diplomazia

11.30 - 13.00 Colosseo Room
Workshop: Pharma Industry. Scientific and Technological Cooperation between Russia and Italy
Organised by Festival della Diplomazia

11.30 - 13.00 Pantheon Room
Workshop: Supplementary health funds and technological innovation
Organised by FASI

14.30 - 16.00 Colosseo Room
Workshop: Regione Lazio policies for the development of the Life Sciences value chain
Organised by Lazio Innova SpA

15.30 - 16.00 Campidoglio Room
Workshop: Lazio Network for translational medicine and tumour biotherapies
Organised by ISS

16.00 - 16.30 Campidoglio Room
Workshop: A_IATRIS, the translational medicine infrastructure and the EATRIS European infrastructure
Organised by ISS

16.30 - 18.00 Colosseo Room
Workshop: API economy in healthcare: ecosystems for healthcare system 4.0
Organised by C.H.I.CO.

- **10 Novembre 2017: convegno “CHIKUNGUNYA 2017”**, organizzato in seguito all'epidemia del virus Chikungunya registrato ad Anzio, Roma e Latina nel settembre 2017 che ha richiesto l'intervento di diverse Istituzioni che a vario livello si sono trovate a dovere identificare l'agente eziologico responsabile di febbri elevate, rash cutanei e forti dolori articolari e a mettere in atto azioni emergenziali per limitare la diffusione della malattia, sia intervenendo contro le zanzare vettrici, sia con un blocco temporaneo delle donazioni di sangue dalle aree di trasmissione conclamata. Il convegno è stato co-organizzato con l'Istituto Superiore di Sanità e ha visto tra i relatori oltre che docenti del DSPMI, membri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, dell'European Center for Disease Control, del Ministero della Salute, dell'Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana, della Direzione Promozione Tutela Ambientale e Benessere degli Animali di ROMA CAPITALE e di ASL Laziali e dell'Emilia Romagna, ed è stato patrocinato dalle Società Italiane di Igiene, di Malattie Infettive e Tropicali, di Microbiologia e di Parassitologia.

RELATORI CONFERMATI • Paola ANGELINI (Servizio Sanità Pubblica, Regione Emilia-Romagna) • Caterina AIELLO (Servizio Igiene e Sanità Pubblica, ASLROMAG) • Maria Rosaria CAPOBIANCHI (Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani) • Claudio DE LIBERATO (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana) • Alessandra DELLA TORRE (Dip. Sanità Pubblica e Malattie Infettive, SAPIENZA) • Domenico DI LALLO (Direzione Salute e Politiche Sociali, Regione LAZIO) • Erika GARCIA (Arboviruses Control Team, Infectious Hazard Management, World Health Organization) • Francesco MARAGLINO (Ministero della Salute) • Gianni REZZA, Caterina RIZZO, Marco DI LUCA (Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Istituto Superiore di Sanità) • Bertrand SUDRE (Unit Surveillance and Response Support, European Centre for Disease Prevention and Control) • Francesco VAIRO (SeRESMI, Servizio Regionale per l'Epidemiologia, Sorveglianza e controllo delle Malattie Infettive, Istituto Nazionale Malattie Infettive "L. Spallanzani" – IRCCS) Responsabili scientifici: Prof.ssa Alessandra DELLA TORRE, Dott. Beniamino CAPUTO (Gruppo di Entomologia Sanitaria, Sez. Parassitologia, DSPMI) La partecipazione al convegno è GRATUITA, ma l'iscrizione è OBBLIGATORIA Si prega di compilare la scheda di adesione e di inviarla in allegato all'indirizzo e-mail chikungunya2017dspmi@uniroma1.it Il Convegno è patrocinato da:   Il Convegno è organizzato con il contributo di:  	  CHIKUNGUNYA 2017 DATI, RISPOSTE, AZIONI E CRITICITA' DATA, RESPONSE, ACTIONS & CRITICAL ASPECTS  Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive Aula Celli 10 novembre 2017, ore 9:00
SCOPO del CONVEGNO L'Italia nell'estate del 2017 è stata teatro di un'epidemia del virus chikungunya, che ha causato oltre 300 casi nel Lazio, poco meno di 100 in Calabria e alcuni casi in altre regioni. Il chikungunya è un virus esotico trasmesso da zanzare, che negli ultimi anni si è reso protagonista di vaste epidemie che fino ad oggi avevano interessato solo regioni tropicali, con l'eccezione del primo outbreak registrato in una regione a clima temperato che nel 2007 ha causato oltre 240 casi a Castiglione di Cervia in Provincia di Ravenna. Protagonista e responsabile di entrambe le epidemie in Italia è l'<i>Aedes albopictus</i>, la zanzara tigre, una specie anch'essa di origine tropicale che, grazie ad un elevato potenziale invasivo, è diventata negli ultimi 30 anni una presenza stabile (e molesta) nella maggior parte delle aree urbane dei paesi europei che affacciano sul Mediterraneo. L'epidemia di chikungunya di quest'anno ha richiesto l'intervento di diverse Istituzioni, soprattutto nel Lazio, che a vario livello si sono trovate a dovere identificare l'agente eziologico responsabile di febbri elevate, rash cutanei e forti dolori articolari e a mettere in atto azioni emergenziali per limitare la diffusione della malattia, sia intervenendo contro le zanzare vettrici, sia con un blocco temporaneo delle donazioni di sangue dalle aree di trasmissione conclamata. Lo scopo del convegno CHIKUNGUNYA 2017 è quello di fornire innanzitutto un quadro generale del problema sanitario rappresentato dal virus chikungunya ed altri virus trasmessi dalla zanzara tigre (es. dengue e Zika) a livello globale e, più in particolare, in Europa ed in Italia, e delle strategie di valutazione del rischio, di prevenzione e di controllo. La tavola rotonda prevista nel pomeriggio ha lo scopo di riunire rappresentanti di tutte le Istituzioni locali coinvolte nell'epidemia di questa estate per un confronto costruttivo sugli elementi positivi e sulle criticità emerse nell'ambito della gestione dell'emergenza, e sulle misure preventive da mettere in atto nei prossimi anni per ridurre il rischio di nuovi eventi epidemici ed aumentare il livello di preparazione a nuove possibili emergenze.	PROGRAMMA 9.00 Saluti di benvenuto Prof. Eugenio GAUDIO (Magnifico Rettore Sapienza) Prof. Carlo DELLA ROCCA (Presidente Facoltà di Farmacia e Medicina) DSPMI, Prof. David MODIANO (Sez. Parassitologia), Prof. Claudio MASTROIANNI (Sez. Malattie Infettive), Prof. Anna Teresa PALAMARA (Sez. Microbiologia); Prof. Paolo VILLARI (Direttore DSPMI) 9.15 Erika GARCIA (WHO) "Mosquito-borne virus prevention and control, a global perspective" 10.00 Bertrand SUDRE (E-CDC) "Aedes albopictus-borne virus prevention and control, an European perspective" 10.45 Coffee-break 11.15 Gianni REZZA (ISS) "Epidemie di chikungunya in Italia: 2007-2017" 11.45 Maria Rosaria CAPOBIANCHI (SPALLANZANI) "Aspetti virologici e diagnostici dell'epidemia di chikungunya in Italia" 12.15 Alessandra DELLA TORRE (SAPIENZA) "Il ruolo della ricerca nella prevenzione dei rischi sanitari associati ad <i>Aedes albopictus</i>" 12.45 Pranzo a buffet Tavola Rotonda "Presente e futuro della sorveglianza e controllo arbovirali in Italia": 14.00 Francesco MARAGLINO (MINISTERO DELLA SALUTE) "Il piano nazionale per la sorveglianza ed il controllo delle arbovirosi in Italia" 14.30 Paola ANGELINI (REGIONE EMILIA-ROMAGNA) "Affrontare il problema chikungunya in Italia: l'esperienza della Regione Emilia Romagna durante e dopo l'epidemia del 2007" 15.00 Domenico DI LALLO (REGIONE LAZIO) "Affrontare il problema chikungunya in Italia: l'esperienza della Regione Lazio durante i focolai epidemici del 2017" Seguiranno altri interventi programmati (vedi elenco relatori confermati) e discussione

- **13 Aprile 2018: Convegno Finale del Progetto “Nuove metodologie nella diagnosi e prevenzione di infezioni batteriche, virali, fungine e parassitarie”.** Il convegno è stato introdotto dal Magnifico Rettore dell’Università di Roma SAPIENZA, prof. Eugenio Gaudio, dal Presidente di Lazio Innova, Dott. Stefano Fantacone, e dal Presidente A.N.I.D., Dott. Marco BENEDETTI, e ha visto un’ampia partecipazione di membri del DSPMI, di altre Istituzioni pubbliche presenti nel Lazio (Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Istituto Nazionale Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana, ASL). Il programma si è svolto in due sessioni parallele, la Sessione A focalizzata su “Nuove sfide e prospettive nel controllo e nel monitoraggio delle infezioni batteriche e virali” e la Sessione B focalizzata su “Nuove sfide e prospettive nel controllo e nel monitoraggio delle zanzare in Italia” (vedi programmi in allegato). Inoltre, nel pomeriggio sono state organizzate due Tavole Rotonde. La prima intitolata “Esigenze e potenzialità di formazione nel campo della prevenzione di malattie trasmesse da vettori in Italia” ha messo a confronto la richiesta di formazione a livello delle strutture pubbliche (Ministero Salute, Medici di Base, ASL, Regioni, Comuni) e private (Ditte di Disinfestazione) e le potenzialità di formazione a livello universitario e da parte di Enti con specifica esperienza nel campo per attivare nel breve e medio periodo nuove specifiche iniziative di formazione mirate a riempire le reali necessità in un settore la cui rilevanza nella salute pubblica è sempre più crescente in Italia. La seconda intitolata “Possibili sinergie nell’attuazione dei piani di sorveglianza e controllo dei culicidi (e dei patogeni da essi trasmessi) nel Lazio” è servita ad avviare ragionamenti sulle indicazioni del Piano Nazionale di Sorveglianza e Risposta alle Arbovirosi Trasmesse da Zanzare 2018 del Ministero della Salute e sulla possibilità di superare le possibili criticità attuative tramite una sinergia tra tutte le Istituzioni coinvolte.



Aula Celli e Aula B
13 aprile 2018

NUOVE METODOLOGIE NELLA DIAGNOSI E PREVENZIONE DI INFEZIONI BATTERICHE, VIRALI, FUNGINE E PARASSITARIE

9:00-9:30 SALUTI DI BENVENUTO
Prof. Piera VALENTI, Responsabile Scientifico del Progetto
Prof. Eugenio GAUDIO, Rettore Università di Roma La Sapienza
Dott. Stefano FANTACONE, Presidente Lazio Innova
Dott. Marco BENEDETTI, Presidente A.N.I.D.
Prof. Paolo VILLARI, Direttore del DSPMI

APERTURA DEL CONVEGNO
Prof.ssa Piera VALENTI, Responsabile Scientifico del Progetto- AULA A
Prof.ssa Alessandra della TORRE, Co-Responsabile scientifico del Progetto-AULA B

SESSIONE A – Aula Celli
NUOVE SFIDE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO e NEL MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI BATTERICHE E VIRALI

Sessione B - NUOVE SFIDE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO e NEL MONITORAGGIO DELLE ZANZARE IN ITALIA

NUOVE METODOLOGIE NELLA DIAGNOSI E PREVENZIONE DI INFEZIONI BATTERICHE, VIRALI, FUNGINE E PARASSITARIE

SESSIONE A – Aula Celli

NUOVE SFIDE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO e NEL MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI BATTERICHE E VIRALI

10:00-10:15	Prof.ssa Piera VALENTI (Responsabile Scientifico del Progetto) Introduzione
10:15-10:30	Dott.ssa Alessandra OLIVA (Policlinico Umberto I°) “Diagnosi microbiologica delle infezioni associate a biofilm mediante la tecnica della sonicazione”
10:30-10:50	Dott. Luigi ROSA (Università Sapienza) “BioTimer Assay, un metodo innovativo nell’enumerazione di batteri adesivi, aggregati e in biofilm a device medici”
10:50-11:00	DISCUSSIONE
11:00-11:30	Coffee break
11:30-11:50	Dott.ssa Marisa DI PIETRO (Università Sapienza) Importanza del biofilm nelle infezioni genitali da <i>Chlamydia trachomatis</i>
11:50-12:10	Prof.ssa Lucia NENCIONI (Università Sapienza) “Utilizzo della strumentazione Odyssey per la titolazione di virus a DNA e RNA”
12:10-12:30	Dott.ssa Aurelia GAETA (Università Sapienza) “Applicazione di test molecolari nello screening dell’infezione congenita da Citomegalovirus”
12:30 – 13:00	DISCUSSIONE
13.00 – 14:00	PRANZO A BUFFET
14:00-14:20	Dott.ssa Alessia COTTARELLI (Università Sapienza) “Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni alimentari di provenienza sia alimentare che clinica da utilizzarsi nel processo di Rapid Risk Assessment a livello punti di ingresso frontaliero”
14:20-14:40	Prof. Paolo VILLARI (Università Sapienza) “Metodi di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all’assistenza nei reparti a più elevato rischio infettivo”
14:40-14:50	DISCUSSIONE
14:50-15:10	Prof.ssa Simonetta MATTIUCCI (Università Sapienza) “Identificazione e caratterizzazione di parassiti zoonotici nel pescato”
15:10-15:30	Dott.ssa Simona GABRIELLI (Università Sapienza) “Metodologie innovative per la diagnosi di parassitosi umane”
15:30-15:50	Dott.ssa Serena CAVALLERO (Università Sapienza) “Caratterizzazione genetica di elminti a trasmissione zoonotica nel bacino del Mediterraneo”
15:50-16:00	DISCUSSIONE
16:00-16:10	CONCLUSIONI

**NUOVE METODOLOGIE NELLA DIAGNOSI E PREVENZIONE DI INFEZIONI
BATTERICHE, VIRALI, FUNGINE E PARASSITARIE**

**Sessione B - NUOVE SFIDE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO
e NEL MONITORAGGIO DELLE ZANZARE IN ITALIA**

- 9.20 - Alessandra DELLA TORRE (UNIVERSITA' SAPIENZA)**
Marco BENEDETTI - Presidente A.N.I.D.
INTRODUZIONE E BENVENUTO
- 9.30 - Francesco MARAGLINO (MINISTERO DELLA SALUTE) "Il piano nazionale
2018 per la sorveglianza ed il controllo delle arbovirosi in Italia"**
- 9.45 - Marco DI LUCA (ISTITUTO SUPERIORE di SANITA') "L'allegato 4 del piano
nazionale 2018 per la sorveglianza ed il controllo delle arbovirosi in Italia"**
- 10.00 - Raffaella PERRONE (MINISTERO DELLA SALUTE) "Il Regolamento 528/2012
della Direttiva Biocidi"**
- 10.20 - Beniamino CAPUTO (UNIVERSITA' SAPIENZA) "Sfide e nuove prospettive
nel controllo della zanzara tigre"**
- 10.40 - DISCUSSIONE**
- 11.00 - Coffe-break**
- 11.30 - Sergio URIZIO (ASSOCIAZIONE NAZIONALE DELLE IMPRESE DI
DISINFESTAZIONE) "La formazione ed i requisiti dell'operatore
professionale nella disinfestazione"**
- 11.50 - Carlo CONTALDI LA GROTTIERA (Studio Legale AdLaw) "L'adozione di un
Regolamento in sostituzione delle Ordinanze nell'affidamento dei servizi di
disinfestazione"**
- 12.10 - Alessandra DELLA TORRE (UNIVERSITA' SAPIENZA) "Sfide e nuove
prospettive nel monitoraggio della zanzara tigre"**
- 12.30 - DISCUSSIONE**
- 13.00 - Pranzo a buffet**

**NUOVE METODOLOGIE NELLA DIAGNOSI E PREVENZIONE DI INFEZIONI
BATTERICHE, VIRALI, FUNGINE E PARASSITARIE
Sessione B - NUOVE SFIDE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO
e NEL MONITORAGGIO DELLE ZANZARE IN ITALIA**

TAVOLE ROTONDE

**14.00- ESIGENZE e POTENZIALITÀ di FORMAZIONE NEL CAMPO DELLA
PREVENZIONE di MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI in ITALIA**

Obiettivo: mettere a confronto la richiesta di formazione a livello delle strutture pubbliche (Ministero Salute, Medici di Base, ASL, Regioni, Comuni) e private (Ditte di Disinfestazione) e le potenzialità di formazione a livello universitario e da parte di Enti con specifica esperienza nel campo per attivare nel breve e medio periodo nuove specifiche iniziative di formazione mirate a riempire le reali necessità in un settore la cui rilevanza nella salute pubblica è sempre più crescente in Italia.

Interverranno tra gli altri:

- 1) Patrizia PARODI (Ministero della Salute): La necessità della formazione a livello nel Sistema Sanitario Nazionale
- 3) Gianluca RUSSO (SAPIENZA): Criticità nella formazione dei medici di base
- 4) Marco BENEDETTI (ANID) Corsi e future necessità per operatori professionali delle ditte di disinfestazione e amministratori di condominio
- 5) Claudio DE LIBERATO (IZS/LT) La formazione per gli operatori delle ASL del Lazio
- 6) Alessandra DELLA TORRE (SAPIENZA): Potenzialità dell'offerta formativa universitaria

**15.30- POSSIBILI SINERGIE nell'ATTUAZIONE dei PIANI di SORVEGLIANZA e
CONTROLLO dei CULICIDI (e dei PATOGENI da ESSI TRASMESSI) nel LAZIO**

Obiettivo: avviare ragionamenti sulle indicazioni del Piano Nazionale di Sorveglianza e Risposta alle Arbovirosi Trasmesse da Zanzare 2018 del Ministero della Salute e sulla possibilità di superare le possibili criticità attuative tramite una sinergia tra tutte le Istituzioni coinvolte.

Interverranno tra gli altri:

- Marco BENEDETTI (Presidente ANID)
- Beniamino CAPUTO (Sapienza)
- Claudio DE LIBERATO (IZS-Lazio e Toscana)
- Marco DI LUCA (ISS)
- Paola SCOGNAMIGLIO/Francesco VAIRO (Seresmi)
- Rappresentanti di Comuni
- Rappresentanti di ASL

-Infine, nel corso del progetto sono state organizzate 4 riunioni di confronto e condivisione di obiettivi, approcci, risultati e criticità tra i vari gruppi di ricerca del DSPMI. Queste riunioni sono state molto partecipate – anche da membri del DSPMI non direttamente coinvolti nel progetto – e hanno rappresentato un momento di condivisione e confronto molto importante tra le varie sezioni del Dipartimento (Microbiologia, Parassitologia, Malattie Infettive, Igiene e Statistica) creando delle sinergie e nuove idee progettuali. I Programmi di queste riunioni sono di seguito allegati.

▪ **27 GENNAIO 2016:** presentazione delle Linee di Ricerca. Discussione e ricerca di sinergie all'interno del DSPMI.

▪ **7 LUGLIO 2016:** presentazione degli avanzamenti delle Linee di Ricerca e discussione delle criticità.

▪ **14 OTTOBRE 2016:** presentazione degli avanzamenti delle Linee di Ricerca nel primo anno di finanziamento e preparazione report I anno di attività del progetto (vedi programma di seguito allegato)

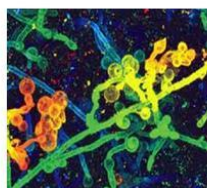
▪ **28 febbraio 2018:** presentazione dei risultati e finali del progetto dell'innovazione ottenuta rispetto allo stato dell'arte e organizzazione convegno finale (vedi programma di seguito allegato)



FORMAZIONE E TRASFERIMENTO DI METODOLOGIE INNOVATIVE AD IMPRESE DEL LAZIO O DEI PAESI DEL MEDITERRANEO COINVOLTE NELLO STUDIO DI INFEZIONI BATTERICHE, VIRALI, FUNGINE e PARASSITARIE

AULA ANGELO CELLI
14 ottobre 2016, ore 9:00

9.00-9.10		Saluti	Paolo Villari (Direttore) & Piera Valenti (PI)
9.10-9.30		Introduzione	Alessandra della Torre (CO-PI)
LINEA 1 - STRUMENTI INNOVATIVI PER LA DIAGNOSI DI PATOGENI			
9.20-9.40	M1.1, M1.2	Metodi innovativi per la conta di batteri adesivi, aggregati e in biofilm. Antibiotogramma su batteri adesivi a cateteri venosi centrali. Controllo di qualità microbiologica di bio- e nano-materiali	Antimo CUTONE (Assegnista FILAS)
9.40-10.00	M-1.1, M1.1	Sonicazione di batteri adesivi, aggregati e in biofilm e Valutazione critica tra il metodo classico della sonicazione e quello innovativo del BioTimer	Alessandra OLIVA (Assegnista)
10.00-10.20	M-1.3	Biotimer assay nell'enumerazione di batteri adesivi o in biofilm a pacemaker, a elettrodi atriali, ventricolari e ad altri dispositivi medici	Luigi ROSA (Borsista FILAS)
10.20-10.40	M-1.1, M1.2	Importanza del biofilm nelle infezioni genitali da <i>Chlamydia trachomatis</i>	Simone FILARDO (Medico Specializzando)
10.40-11.00		Coffe break	
11.00-11.20	M-1.4	Utilizzo della strumentazione Odyssey per la titolazione di virus a DNA e a RNA	Marco FABIANI (Dottorando in Malattie infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica)
11.20-11.40	M-1.4	Isolamento e caratterizzazione del Poliovirus umano JC in campioni biologici e studi in vitro della capacità replicativa e della organizzazione strutturale della variante ARCHETYPE CY in modelli cellulari di infezione latente e produttiva.	Carla PREZIOSO (Laureanda)
11.40-12.00	P-1.1	Metodologie innovative per la diagnosi di parassitosi umane	Simona GABRIELLI (PI, RIC)
12.00-12.20	P-1.1	Caratterizzazione genetica di elminti a trasmissione zoonotica circolanti nel bacino del Mediterraneo	Serena CAVALLERO (Post-Doc, Borsista FILAS)
12.20-12.40	P-2.3	Quantificazione molecolare del serbatoio infettivo per la trasmissione della malaria dall'uomo al vettore tramite Real Time qPCR	Pamela AVELLINO (Post-Doc)
12.40-14.00		Pausa pranzo	
LINEA 2 - STRUMENTI INNOVATIVI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI PATOGENI E DA CONTAMINANTI AMBIENTALI			
14.00-14.20	M-2.1	Applicazione di test molecolari nello screening dell'infezione congenita da Citomegalovirus	Ilaria SCIANDRA (Specializzanda in Microbiologia e Virologia)
14.20-14.40	P-2.2	Messa a punto di saggi ELISA per la valutazione dell'esposizione umana a vettori di arbovirus (zanzare Aedes)	Bruno ARCA' (PI, RIC)
14.40-15.00	P-2.4	Identificazione di parassiti zoonotici nel pescato e caratterizzazione dei loro antigeni: metodologie innovative	Marialetizia PALOMBA (Dottoranda in Ecologia e gestione sostenibile delle risorse ambientali)
15.00-15.20	I-2.2	Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni alimentari di provenienza sia alimentare che clinica da utilizzarsi nel processo di rapid risk assessment a livello di punti di ingresso frontaliere.	Alessia COTTARELLI (Borsista FILAS)
15.20-15.40	I-2.2	Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni ospedalieri di provenienza sia ambientale che clinica da utilizzarsi in protocolli di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all'assistenza nei reparti a più elevato rischio di infezione.	Valentina BACCOLINI (Specializzanda in Igiene e Medicina Preventiva)
LINEA 3 - IMPLEMENTAZIONE DI TECNOLOGIE INNOVATIVE DI INTERESSE IN SANITÀ PUBBLICA			
15.40-16.00	P3.1, P3.2	Nuovi sistemi di monitoraggio di <i>Aedes albopictus</i> (la zanzara tigre) e di valutazione dell'efficacia di strategie di lotta	Beniamino CAPUTO (RTD)
16.00-16.20	P3.2	Applicazione di biosaggi per la valutazione di semiochimici repellenti/attrattivi per insetti ematofagi	Valentina TOTINO (Post-Doc; borsista FILAS); Marco POMBI (RTD)
16.20-16.40	S-1	New measures for evaluating of time-dependent prognostic biomarkers	Danilo ALUNNI FEGATELLI (Post-Doc)
16.40-17.00		Discussione e Conclusioni	Piera VALENTI (PI)



PROGRAMMA RIUNIONE PROGETTO FILAS, 28-02-2018

9.00-9.10		Introduzione	Piera Valenti (PI), Alessandra della Torre (co-PI)
LINEA 1- STRUMENTI INNOVATIVI PER LA DIAGNOSI DI PATOGENI (BATTERI)			
9.10-9.20	M1.1	Concentrazione di metalli all'interno di cellule mediante raggi-X	Piera VALENTI (PI)
9.20-9.40	M1.1, M1.2	Metodi innovativi per la conta di batteri adesivi, aggregati e in biofilm. Antibiotogramma su batteri adesivi a cateteri venosi centrali. Controllo di qualità microbiologica di bio- e nano-materiali	Antimo CUTONE (Assegnista FILAS)
9.40-10.00	M-1.1 MI-1.1	Sonificazione di batteri adesivi, aggregati e in biofilm e Valutazione critica tra il metodo classico della sonificazione e quello innovativo del BioTimer	Alessandra OLIVA (Assegnista)
10.00-10.20	M-1.3	Biotimer assay nell'enumerazione di batteri adesivi o in biofilm a pacemaker, a elettrodi atriali, ventricolari e ad altri dispositivi medici	Luigi ROSA (Borsista FILAS)
10.20-10.40	M-1.1, M1.2	Importanza del biofilm nelle infezioni genitali da <i>Chlamydia trachomatis</i>	Giulia TRANQUILLI (Specialista in Microbiologia e Virologia)
10.40-11.10		Coffe break	
LINEA 1- STRUMENTI INNOVATIVI PER LA DIAGNOSI DI PATOGENI (PARASSITI)			
11.10-11.30	P-1.1	Metodologie innovative per la diagnosi di parassitosi umane	Simona GABRIELLI (PI, RIC)
11.30-11.50	P-1.1	Caratterizzazione genetica di elminti a trasmissione zoonotica circolanti nel bacino del Mediterraneo	Serena CAVALLERO (Post-Doc, Borsista FILAS)
LINEA 2 - STRUMENTI INNOVATIVI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI PATOGENI (PARASSITI)			
11.50-12.20	P-2.2	Messa a punto di saggi ELISA per la valutazione dell'esposizione umana a vettori di arbovirus (zanzare Aedes)	Sara Buezo MONTERO (Borsista FILAS, e Dottoranda Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica)
12.10-12.30	P-2.3	Quantificazione molecolare del serbatoio infettivo per la trasmissione della malaria dall'uomo al vettore tramite Real Time qPCR	Pamela AVELLINO (Post-Doc)
12.30-12.50	P-2.4	Identificazione di parassiti zoonotici nel pescato e caratterizzazione dei loro antigeni: metodologie innovative	Marialetizia PALOMBA (Dottoranda in Ecologia e gestione sostenibile delle risorse ambientali)
LINEA 3 -IMPLEMENTAZIONE DI TECNOLOGIE INNOVATIVE DI INTERESSE IN SANITÀ PUBBLICA			
12.50-13.10	P3.1, P3.2	Nuovi sistemi di monitoraggio di <i>Aedes albopictus</i> (la zanzara tigre) e di valutazione dell'efficacia di strategie di lotta	Alessandra DELLA TORRE (PA)
13.10-13.30	P3.2	Applicazione di biosaggi per la valutazione di semiochimici repellenti/attrattivi per insetti ematofagi	Valentina TOTINO (Borsista FILAS); Marco POMBI (RTD)
13.30-14.30		Pausa pranzo	
14.30-14.50	S-1	New measures for evaluating of time-dependent prognostic biomarkers	Daniilo ALUNNI FEGATELLI (Post-Doc)
LINEA 1- STRUMENTI INNOVATIVI PER LA DIAGNOSI DI PATOGENI (VIRUS)			
14.50-15.20	M-1.4	Utilizzo della strumentazione Odyssey per la titolazione di virus a DNA e a RNA	Anna Teresa PALAMARA (PO) Meysam SAESHARERYANDEH (Dottore in MALATTIE INFETTIVE, MICROBIOLOGIA E SANITA' PUBBLICA)
15.20-15.40	M-1.4	Isolamento e caratterizzazione del Polyomavirus umano JC in campioni biologici e studi in vitro della capacità replicativa e della organizzazione strutturale della variante ARCHETYPE CY in modelli cellulari di infezione latente e produttiva.	Carla PREZIOSO (Borsista FILAS)
15.40-16.00	M-2.1	Applicazione di test molecolari nello screening dell'infezione congenita da Citomegalovirus	Ilaria SCIANDRA (Borsista FILAS e Specialista in Microbiologia e Virologia)
LINEA 2 - STRUMENTI INNOVATIVI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI PATOGENI E DA CONTAMINANTI AMBIENTALI			
16.00-16.20	I-2.2	Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni alimentari di provenienza sia alimentare che clinica da utilizzarsi nel processo di rapid risk assessment a livello di punti di ingresso frontali.	Alessia COTTARELLI (Borsista FILAS)
16.20-16.40	I-2.2	Metodi per la caratterizzazione epidemiologica di patogeni ospedalieri di provenienza sia ambientale che clinica da utilizzarsi in protocolli di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all'assistenza nei reparti a più elevato rischio di infezione.	Valentina BACCOLINI (Specializzanda in Igiene e Medicina Preventiva)
16.40-17.00		Discussione, Preparazione Convegno 13 aprile 2018 e Conclusioni	Piera VALENTI (PI)