PROGETTI FINANZIATI FONDI 2023

Sono di seguito riportati gli abstract dei progetti finanziati con i fondi 5xmille (anno 2023).

1.1. Ottimizzazione della diagnosi di schistosomiasi genitale femminile tramite auto-campionamento e rilevamento molecolare: lo studio Opti-ShWAB

La diagnosi di schistosomiasi genitale femminile (FGS) è complessa e lo sviluppo di test diagnostici point-of-care per questa malattia è stato indicato come priorità dall'OMS nel documento programmatico per il controllo delle malattie tropicali neglette 2021-2030. Le manifestazioni cliniche sono in gran parte aspecifiche, causando spesso la diagnosi errata di malattie sessualmente trasmissibili (MST) o tumori genitali, con conseguenti conseguenze sanitarie e sociali, e la diagnosi parassitologica o colposcopica è poco sensibile. Lo screening per l'HPV su campioni genitali auto-prodotti si è dimostrato accurato quanto la diagnosi su campioni raccolti dagli operatori sanitari e altamente accettabile. Studi recenti, tra cui uno condotto dal nostro gruppo in Tanzania, hanno esplorato il rilevamento molecolare del DNA di Schistosoma haematobium su campioni genitali, inclusi tamponi cervico-vaginali auto-prodotti, con risultati positivi in termini di accuratezza e accettabilità. Questo studio si propone di determinare la prevalenza della FGS tra le donne residenti nell'area circostante Lambarene, in Gabon, applicando e confrontando preliminarmente le prestazioni di un metodo di autocampionamento di riferimento che prevede il trasporto a catena del freddo e di due metodi di campionamento, validati per la diagnosi di altri patogeni (e quindi applicabili anche alla diagnosi di HPV e altre MST), che consentono il trasporto a temperatura ambiente, seguito da analisi molecolare mediante rtPCR e ddPCR. Verrà inoltre implementato un questionario KAP (Knowledge, Attitude, Practice), che includerà anche domande sull'accettabilità dell'autocampionamento dei genitali in questo contesto.

1.2 Sviluppo di un modello in vitro basato su organoidi intestinali umani per lo studio di Strongyloides stercoralis (OrganoiSS)

La strongiloidosi, causata dall'elminta Strongyloides stercoralis, è una malattia tropicale negletta (NTD) che colpisce milioni di persone nel mondo. Il suo ciclo di vita è unico tra i nematodi umani, poiché alterna fasi a vita libera e parassitaria, con la possibilità di instaurare un ciclo auto-infettivo che consente la persistenza cronica dell'infezione per anni, anche in assenza di nuove esposizioni. L'infezione può rimanere asintomatica o manifestarsi con sintomi gastrointestinali, cutanei e respiratori, e nei soggetti immunocompromessi può evolvere in forme gravi e potenzialmente letali. Nonostante la rilevanza clinica e l'impatto globale, la biologia di S. stercoralis e i meccanismi

molecolari alla base della cronicizzazione e della patogenesi rimangono ancora in larga parte sconosciuti.

La maggior parte delle conoscenze attualmente disponibili è basata su evidenze raccolte attraverso l'utilizzo del gerbillo come modello animale, ma questo approccio presenta numerose limitazioni scientifiche, etiche e pratiche. Negli ultimi anni, la ricerca biomedica ha spinto verso lo sviluppo di modelli in vitro più rappresentativi della fisiologia umana. In questo contesto, gli organoidi intestinali umani, essendo in grado di ricapitolare l'architettura tridimensionale e la composizione cellulare del tessuto d'origine, rappresentano una valida alternativa ai modelli animali per lo studio dei meccanismi di interazione tra ospite-patogeno.

Nel nostro laboratorio, grazie anche ai fondi 5x1000 stanziati lo scorso anno per il progetto "CellMod", abbiamo recentemente sviluppato un sistema in vitro 3D basato su linee cellulari umane che ha dimostrato come la presenza di cellule umane sia cruciale per supportare lo sviluppo delle larve infettive (iL3) di S. stercoralis, benché non abbastanza per il completo sviluppo del parassita.

Partendo da questi risultati, il nostro obiettivo è ora quello di implementare un modello basato su organoidi intestinali umani per ricreare in vitro il ciclo parassitico, fino alla differenziazione in femmine adulte. Questo sistema non solo offrirà una piattaforma innovativa per studiare le fasi di sviluppo del parassita, ma permetterà anche di esplorare le dinamiche dell'interazione tra le iL3 di S. stercoralis e i diversi tipi cellulari presenti nel microambiente intestinale umano. Inoltre, potrà essere impiegato per analisi multi-omiche (p.e. trascrittomica e proteomica) volte alla caratterizzazione sia del parassita che allo studio dell'interazione con l'ospite, per lo screening di farmaci antiparassitari, e per indagare le risposte immunitarie locali in un contesto fisiologicamente rilevante.

Lo sviluppo di questo sistema rappresenta un valore aggiunto per la ricerca biomedica nell'ambito della microbiologia e parassitologia, essendo ampiamente adattabile, potrà essere modulato o esteso per studiare altri patogeni di interesse.

A rafforzare il progetto è la collaborazione con la Dr.ssa Maria Duque-Correa del Cambridge Stem Cell Institute, esperta a livello internazionale nello sviluppo di modelli di organoide per l'analisi delle infezioni da nematodi intestinali. Il suo lavoro pionieristico sull'uso di mini-guts murini per studiare Trichuris muris ha aperto nuove prospettive nello studio delle interazioni ospite-parassita, e la sua collaborazione apporta al progetto competenze essenziali nella caratterizzazione funzionale del modello in vitro.

Questo progetto vuole inoltre apportare un'importante innovazione nei modelli sperimentali presenti presso il nostro centro per lo studio di S. stercoralis, con l'obiettivo di contribuire ad una maggior comprensione della biologia del parassita e di promuovere nuove strategie diagnostiche e terapeutiche in ambito NTD.

1.3 Implementazione di modelli cellulari in vitro per lo studio delle malattie infettive e tropicali (CelMod2)

In continuità con gli studi realizzati con il precedente progetto CELMOD, il progetto attuale si prefigge di implementare nuovi modelli in vitro a sostegno di studi sempre più approfonditi sui patogeni e la loro

interazione con l'ospite umano. In particolare, verranno sviluppati studi di attivazione di cellule del sistema immunitario con antigeni del patogeno o con il patogeno stesso (es. studi di stimolazione di leucociti con antigeni di SARS-CoV-2 od Oropuoche virus). Verranno inoltre condotti studi di infezione in presenza di sostanze che potrebbero modulare l'attività virale. Grazie alle varie collaborazioni messe in atto dal nostro dipartimento, sarà inoltre possibile raffinare alcuni modelli di parassiti in presenza non solo di linee cellulari immortalizzate, ma anche di cellule primarie da campioni clinici e sarà inoltre possibile mettere a punto modelli basati su organoidi (es. per il modello in vitro del parassita Strongyloides stercoralis). I modelli in vitro sono indubbiamente uno strumento fondamentale per la ricerca nel nostro dipartimento e forniscono un supporto trasversale a tutte le linee di ricerca del nostro IRCCS. Attraverso i modelli in vitro sarà infatti possibile non solo approfondire la conoscenza sui meccanismi patogenetici dei microorganismi oggetto di studio nel nostro dipartimento, ma anche supportare lo sviluppo di nuovi test diagnostici.

1.4 Droplet-digital PCR per la rilevazione di DNA extracellulare circolante nei campioni di plasma e urine in pazienti con echinococcosi cistica: uno studio esplorativo (Echino ddPCR plus)

L'echinococcosi cistica è una zoonosi parassitaria complessa e potenzialmente grave, endemica in tutto il mondo, compresa l'Italia e molte aree di intensa immigrazione verso l'Italia (Nord Africa, Europa orientale). La sua diagnosi si basa sull'imaging, ma l'ampia gamma di diagnos differenziali e i limiti degli attuali test sierologici rendono difficile la diagnosi finale, con conseguenze anche gravi per il paziente. Inoltre mancano metodi di laboratorio in grado di valutare l'attività/inattività dell'infezione. Negli ultimi anni, la potenziale utilità diagnostica della rilevazione del DNA libero circolante (cell-free DA; cfDNA) nei fluidi biologici (ad esempio plasma e urina) è stata esplorata anche per l'echinococcosi cistica. Tuttavia, fin'ora solo pochi studi hanno applicato, per la riceca di cfDNA di Echinococcus granulousus, tecniche implementabili in contesti clinici. Inoltre i risultati di sensibilità fino ad ora ottenuti non sono sufficienti per l'applicazione clinica. In questo studio proposto, applicheremo la tecnica droplet digital PCR (ddPCT), che si è rivelata più sensibile di altre tecniche di amplificazione degli acidi nucleici, su campioni di plasma e urina di pazienti con echinococcosi cistica epatica non trattata e con lesioni focali epatiche non echinococciche, con l'obiettivo di valutare preliminarmente il potenziale utilizzo della ddPCR come metodo di rilevamento di cfDNA parassitario per la diagnosi eziologica di echinococcosi cistica.

1.5 Screening e monitoraggio delle malattie infettive nei migranti ospiti di strutture di accoglienza

I protocolli di screening per le malattie infettive nei migranti di recente arrivo sono fondamentali per rilevare infezioni che hanno una bassa prevalenza nel paese di arrivo e trattarle tempestivamente. Nella pratica esiste ancora una rilevante incertezza e variabilità delle pratiche adottate nei diversi contesti regionali e locali, anche in virtù della mancanza di obbligatorietà dello screening. Questo comporta una limitazione all'accesso dei migranti allo screening. Il progetto si pone come finalità quello di effettuare

lo screening direttamente nei centri di accoglienza, semplificando notevolmente l'accesso dei migranti ai servizi medici. L'obiettivo primario consiste nella stima della prevalenza di una serie di infezioni/patologie infettive in una coorte di richiedenti asilo ospiti di centri di prima accoglienza, arrivati in Italia da almeno 2 mesi e non oltre 18 mesi. Le infezioni di interesse sono: tubercolosi latente e tubercolosi attiva, HIV, HBV, HCV, sifilide, strongiloidiasi, schistosomiasi, filariasi, elmintiasi intestinali. L'obiettivo secondario consiste nella stima della prevalenza delle infezioni di interesse stratificata per macro-area geografica di provenienza dei richiedenti asilo (Nord-Africa, Africa Sub-Sahariana, Asia).

1.6 Studi sui meccanismi patogenetici viro-immunologici dell'infezione da virus Oropouche: focus sull'immunità innata e sulla capacità replicativa in linfomonociti e granulociti (INIMOROV)

Dalla fine del 2023, è stata osservata una diffusione senza precedenti del virus Oropouche (OROV) in America Latina con gravi conseguenze cliniche, tra cui decessi ed infezione congenita associata a malformazioni fetali. Durante l'attuale epidemia, sono stati segnalati più di 13.000 casi confermati in America Latina, e casi importati in Nord America ed Europa. I fattori associati alla diffusione di OROV in nuove regioni, l'alta incidenza e la patogenesi della malattia causata dal virus sono tuttora sconosciuti. Questa espansione dell'epidemia potrebbe essere correlata a una maggiore efficienza di replicazione e all'evasione immunitaria del ceppo circolante. L'infezione da OROV è stata rilevata nei sieri dei pazienti o nelle cellule del sangue dove il virus persiste a lungo (oltre tre mesi). Tuttavia, i meccanismi alla base della patogenesi virale che scatena la malattia non sono stati definiti. Lo scopo del progetto è quello di cercare di far luce sugli aspetti patogenetici legati alla capacità di persistere del virus all'interno delle cellule del sangue. Le analisi sperimentali verranno effettuate infettando in vitro cellule nucleate del sangue di donatori sani con lo scopo di valutare: i) la capacità replicativa del virus; ii) la capacità di attivare il sistema IFN e la sensibilità del virus all'IFN indotto; iii) la capacità di risposta delle cellule. Lo studio permetterà di ottenere dati utili alla comprensione dei meccanismi patogenetici alla base dell'infezione da OROV.

1.7 Caratterizzazione del viroma nei viaggiatori (VISA)

In un contesto di One Health e patogeni emergenti, l'avvento del next generation sequencing (NGS) ha aumentato enormemente la capacità di scoprire nuovi virus e di determinare lo spettro dei virus (definibile come viroma) presenti in campioni biologici umani e di altri animali oltre che in quelli ambientali. Tali studi hanno portato alla scoperta di nuovi agenti patogeni virali e ad associazioni più ampie del viroma con diverse malattie, tra cui malattie infiammatorie intestinali e HIV/AIDS. Queste scoperte hanno l'obiettivo di fornire importanti informazioni per la prevenzione e preparazione contro nuove minacce infettive oltre che per possibile applicazione in ambito diagnostico e clinico. La maggior parte dei lavori in letteratura descrivono l'analisi del viroma in campioni respiratori, ematici e intestinali e perlopiù in categorie di pazienti fragili come immunocompromessi, bambini e donne in gravidanza. Tuttavia rimane ancora poco esplorato in casistiche di viaggiatori/migranti con

possibile quindi associazione all'area geografica e possibile condizione clinico-sintomatologica al rientro del viaggio.

Lo scopo del presente progetto è quello di analizzare campioni biologici (in particolare fecali) disponibili presso la Tropica Biobank raccolti da viaggiatori al rientro del proprio soggiorno all'estero (in particolare visiting friends and relatives dall'Africa) e per meglio caratterizzare lo spettro dei virus offrendo informazioni a carattere epidemiologico oltre che di caratterizzazione genomica ed evolutiva dei virus identificati e di maggior interesse.

Le analisi sperimentali verranno effettuate utilizzando tecnologia NGS oltre che strumenti informatici per l'analisi di bioinformatica per una rapida e appropriata classificazione delle sequenze virali (virus a DNA e virus a RNA). Lo studio permetterà anche di ottenere dati utili sulla applicazione dell'indagine del viroma ponendo le basi per una gestione sempre più personalizzata del paziente.