

2.1.5 Programma nazionale di valutazione esterna di qualità per la rilevazione degli anticorpi anti-HIV e per i virus epatitici presso i servizi trasfusionali e i laboratori diagnostici

Il programma ha come obiettivo quello di mantenere sotto controllo la performance dei servizi trasfusionali (ST) e dei laboratori diagnostici (LD) nell'eseguire i saggi per la ricerca degli anticorpi diretti contro il virus dell'immunodeficienza (HIV) e contro il virus dell'epatite C (HCV) e dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg).

Infatti, in mancanza di possibilità di eseguire ispezioni presso gli ST e gli LD, non previste dall'attuale normativa, il programma rappresenta l'unico mezzo disponibile all'autorità nazionale per conoscere e monitorare la qualità dei servizi prestati dai singoli ST e LD e, in particolare, del sangue/plasma trasfusi. Inoltre il programma consente di valutare la performance dei kit diagnostici "sul campo": nel passato ha per esempio messo in evidenza, per alcuni kit, la possibilità di una variabilità tra lotti tale da incidere sulle loro caratteristiche di sensibilità e specificità. In questi casi è stata avviata la procedura di controllo di Stato lotto per lotto per alcuni kit per la rilevazione di HBsAg.

Lo scopo del programma è quindi di: misurare la capacità degli ST e degli LD nella corretta esecuzione dei saggi in condizioni routinarie; paragonare i risultati ottenuti con reagenti diversi in diversi laboratori; fornire ai partecipanti un mezzo per autovalutare le proprie prestazioni, permettendo l'identificazione di errori casuali e/o sistematici al fine di adottare le opportune misure correttive; garantire, per quanto è compatibile con le attuali conoscenze scientifiche, la sicurezza della trasfusione di sangue e della diagnosi di infezione da HIV, HBV e HCV.

Il programma è organizzato e attuato dall'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con il III Laboratorio di analisi cliniche - Spedali Civili di Brescia e con il Servizio di immunoematologia e trasfusione del Policlinico di Milano.

Il ricorso a centri esterni si è reso necessario perché: l'Istituto non dispone di un centro trasfusionale presso il quale afferiscono i donatori da selezionare e da sottoporre a prelievo di sangue da usare per la preparazione dei campioni; in ogni programma di questo genere è necessario disporre di laboratori di riferimento nei quali i campioni finali possano essere caratterizzati prima della spedizione ai partecipanti.

L'adesione al programma è volontaria e gratuita e, al fine di garantire la riservatezza dei risultati, ad ogni partecipante è assegnato un codice identificativo, noto solo all'ISS, attraverso il quale vengono intrattenuti tutti i rapporti.

Attività svolta

Il numero dei partecipanti al programma è aumentato nel corso degli anni. Attualmente partecipano 340 servizi trasfusionali e 192 laboratori diagnostici distribuiti in tutto il territorio nazionale. Questi ultimi sono stati identificati a seguito di una indagine preliminare effettuata presso tutte le regioni.

Disegno del programma. - Lo schema è simile ad altri programmi di valutazione esterna di qualità internazionali, europei ed extra-europei, e prevede l'invio quadrimestrale di pannelli di sieri positivi e negativi, opportunamente codificati; in particolare, vengono inviati 5 campioni per il saggio di ricerca degli anticorpi anti-HIV, 3 campioni per il saggio di ricerca degli anticorpi anti-HCV e 3 per il saggio di ricerca dell'HBsAg. Per valutare la riproducibilità fra

i saggi è previsto l'impiego di campioni in duplicato, aventi codici diversi, sia nello stesso invio che tra invii differenti.

I campioni inviati sono costituiti da siero umano proveniente da pool di donatori di sangue e da singoli pazienti. Ai campioni vengono aggiunti agenti conservanti, quali mertiolato di sodio, e antibatterici, quali solfato di neomicina (0,01 g/100 ml). Per controllare la stabilità del segnale analitico tutti i pool sono sottoposti a prove di stabilità per un periodo minimo di 3 settimane, a 4°C e a temperatura ambiente. Le procedure di confezionamento vengono eseguite secondo le norme di sicurezza indicate dal Ministero della Sanità (circolare n. 16 del 20 luglio 1994).

La spedizione è affidata ad un corriere espresso, in maniera da raggiungere entro 72 ore tutti i partecipanti. Questi sono invitati ad eseguire le analisi in condizioni di "routine" nel più breve tempo possibile e ad inviare i risultati, utilizzando gli appositi moduli, entro 30 giorni all'ISS, che provvede all'elaborazione dei dati.

Ai servizi trasfusionali è richiesto di analizzare i campioni con saggi di screening, come richiesto nella loro attività di routine. Ai laboratori diagnostici è richiesto, oltre all'analisi con saggi di screening, per i campioni risultati reattivi a tali saggi, di effettuare i saggi di conferma e quindi fornire una diagnosi di positività o negatività del campione.

Al termine di ogni esercizio l'ISS prepara un rapporto comprendente: l'analisi dei risultati ottenuti dal singolo ST o LD rispetto ai risultati ottenuti dai laboratori di riferimento; l'analisi di tutti i risultati ottenuti per ciascun campione.

Utilizzando questa seconda parte del rapporto il singolo partecipante può confrontare la propria prestazione con quella degli altri partecipanti ed effettuare un'autovalutazione,

così da poter eventualmente adottare misure correttive attraverso la verifica delle procedure di controllo di qualità interno.

Tipologia dei campioni. - Per il saggio anti-HIV sono stati inviati campioni negativi e positivi. I campioni positivi per anti-HIV (da soggetti asintomatici, sintomatici o con AIDS) sono preparati per diluizione in una matrice di siero negativo in modo che la reattività ai saggi di conferma (il più comunemente usato è il Western blot) presenti un pattern anticorpale in accordo con i requisiti di positività definiti dagli organismi internazionali.

In conformità al DM 30 dicembre 1992, che sancisce l'obbligatorietà da parte degli ST a effettuare lo screening per gli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, sono stati inviati anche campioni positivi per quest'ultimo virus.

Per il saggio anti-HCV sono stati inviati campioni negativi e positivi indiluiti. I campioni positivi provengono da soggetti asintomatici e presentano differente reattività nei confronti dei diversi determinanti antigenici: in particolare sono stati inviati campioni con pattern anticorpale completo (reattività per gli epitopi delle regioni "core", NS3, NS4, NS5) o con reattività verso due epitopi ("core", NS3) o con una sola banda ("core").

Per la determinazione dell'HBsAg sono stati inviati campioni negativi e positivi; questi ultimi vengono preparati mediante diluizione in siero negativo di una preparazione standard di riferimento con dosaggio espresso in unità PEI/ml (da 0,20 a 1 U/PEI/ml). In alternativa sono stati utilizzati sieri positivi, diluiti in siero negativo in modo da ottenere la concentrazione prestabilita calibrata in U/PEI/ml.

Risultati relativi ai servizi trasfusionali. - Nel corso del 1995 sono stati effettuati n. 3

invii con la partecipazione, rispettivamente, di 283, 334 e 338 laboratori e una percentuale di risposta del 95%, 94% e 97%.

Nel corso del 1996 sono stati effettuati n. 3 invii con la partecipazione, rispettivamente, di 341, 338 e 338 laboratori e una percentuale di risposta del 93%, 92% e 90%.

Nel corso del 1997 sono stati effettuati n. 2 invii con la partecipazione, rispettivamente, di 339 e 337 laboratori e una percentuale di risposta del 91% e 90%.

Correttezza di classificazione. - La capacità di corretta identificazione è stata generalmente elevata, nei saggi per la ricerca degli anticorpi anti-HIV, sia per i campioni negativi che per i campioni positivi (>99%).

Ugualmente elevata è stata, nel caso dei saggi anti-HCV, la capacità di identificare correttamente i campioni negativi e quelli positivi (>99%).

Per i saggi dell'HBsAg, i campioni negativi sono stati riconosciuti come tali nella maggioranza dei casi (>99%), mentre inferiore alle aspettative è stata la capacità di riconoscimento dei campioni positivi con basso contenuto di antigene (0,20 U/PEI/ml) che, tuttavia, dovrebbero essere correttamente identificati da tutti i reagenti autorizzati.

Un approfondimento dei dati ha rivelato che i risultati errati riscontrati per i campioni a basso titolo erano generalmente ottenuti solo con alcuni particolari kit che, tuttavia, nei laboratori di riferimento erano risultati sensibili a tali livelli. Evidentemente l'utilizzazione di tali kit a livello routinario può risultare in un abbassamento della sensibilità riscontrata in condizioni ottimali. Attualmente alcuni di questi kit non sono più in commercio e, per gli altri, è stato introdotto, come previsto dall'attuale legislazione, un controllo sui singoli lotti per verificare la riproducibilità della produzione e bloccare, eventualmente, quei lotti che non risultassero conformi.

Riproducibilità. - La riproducibilità è stata valutata come la ripetibilità tra i risultati ottenuti sullo stesso campione inviato in duplicato sotto codici diversi, indipendentemente dal fatto che il risultato ottenuto fosse il valore "vero". Per quanto riguarda il test anti-HIV, i dati si riferiscono a campioni positivi. Il valore della riproducibilità tra saggi (*between-assay*) è risultato soddisfacente (dal 75 al 98%), ma proporzionale alla concentrazione dei campioni; tale dato conferma una maggiore difficoltà di riconoscimento dei campioni più diluiti (1:10 - 1:100), già messa in evidenza dai dati relativi alla correttezza di classificazione. Migliore è risultata la riproducibilità nello stesso saggio (*within-assay*) sia per i campioni indiluiti che per quelli diluiti (>99%).

Relativamente al saggio anti-HCV, la buona riproducibilità riscontrata (circa 99%) è riferita solo alla riproducibilità *within-assay*, in quanto non è stato possibile inviare campioni duplicati in saggi differenti per carenza di materiale.

La riproducibilità *between-assay* nei saggi per l'HBsAg, come per la correttezza di classificazione, è influenzata dalla concentrazione dell'antigene del campione (77% per i campioni con 0,20 U/PEI/ml *vs* 85% per i campioni con 0,40 U/PEI/ml). Più elevati (circa il 95%) risultano i valori della riproducibilità *within-assay* e apparentemente non influenzati dalla concentrazione dell'antigene.

Analisi degli errori. - La valutazione della performance degli ST comprende non solo l'analisi degli errori di classificazione ma anche quella relativa ad altri tipi di errore i quali, pur non inficiando il risultato finale, sono tuttavia indice di scarsa attenzione da parte del personale.

In particolare, sono stati presi in esame: utilizzo di kit non autorizzati; non osservanza dei criteri di validità del saggio forniti dal foglietto informativo del kit impiegato (assen-

za del test sui sieri di controllo o mancata verifica della corrispondenza dei loro valori con quelli indicati dal produttore, errori di calcolo del *cut-off*); incoerenza tra il rapporto *cut-off*/densità ottica del campione (CO/DO) e classificazione del campione, indipendentemente dalla correttezza di quest'ultima; errori di trascrizione dei dati (soprattutto riguardo alle cifre dei numeri decimali).

Tutti i tipi di errore sono stati segnalati volta per volta al partecipante in maniera da consentirgli di apportare gli opportuni correttivi, attraverso una verifica e, se necessario, una revisione delle procedure di controllo di qualità interno.

Nel corso degli anni è stato possibile osservare che risultano sensibilmente diminuiti gli errori di classificazione e di utilizzo di kit non autorizzati; gli errori di coerenza si sono mantenuti costanti; quelli relativi ai criteri di validità del saggio sono aumentati a partire dal 1994, ritenendo che la causa principale del permanere di questo tipo di errore sia riconducibile ad un ambito cautelativo, osservato in alcuni ST, che consiste nell'abbassare arbitrariamente il valore numerico del *cut-off*.

Nel caso degli errori di trascrizione si è osservato che, nonostante le ripetute segnalazioni ai responsabili, il loro numero è aumentato, dimostrando che le procedure di controllo di qualità interno sono scarsamente applicate.

Risultati relativi ai laboratori diagnostici. - Nel corso del 1995 sono stati effettuati n. 3 invii con la partecipazione, rispettivamente, di 182, 184 e 186 laboratori e una percentuale di risposte del 90%.

Nel corso del 1996 sono stati effettuati n. 3 invii con la partecipazione, rispettivamente, di 190, 190 e 189 laboratori e una percentuale di risposte dell'89%, 88% e 86%.

Nel corso del 1997 sono stati effettuati n. 2 invii con la partecipazione, rispettivamente, di 191 e 192 laboratori e una percentuale di risposte dell'87% e 88%.

Correttezza di classificazione. - La concordanza fra la classificazione dei campioni (basata sui risultati ottenuti nei laboratori di riferimento) e quella fornita dai laboratori partecipanti è stata molto elevata per i campioni negativi (>99%) o positivi per anti-HIV-1 (98,8%). Alcuni campioni (in particolare i positivi diluiti) sono stati non correttamente identificati come indeterminati al saggio di conferma.

La concordanza è molto più bassa per i campioni positivi per anti-HIV-2 (60-68%). Questo dato è infatti influenzato da: 1) il ricorso per il saggio di screening di kit specifici per il solo HIV-1 (l'obbligatorietà dei kit combinati anti-HIV-1/2 è richiesta solo per lo screening del sangue) e conseguente identificazione del campione come negativo (5,5 - 7,8%); 2) l'utilizzo di saggi di conferma (perlopiù Western blot) specifici per HIV-1, che non presentano una banda specifica per HIV-2, con il risultato di un pattern anticorpale indeterminato secondo i criteri di classificazione per anti-HIV-1 (25-30%).

Elevata è la correttezza di classificazione per i sieri negativi (>99%) o positivi (per 2 o 4 bande) per anti-HCV (>99%). Circa il 50% dei laboratori ha indicato come indeterminato un campione con reattività per una sola banda "core", se valutato nel saggio di conferma.

Nel caso dei saggi per HBsAg, si sono riscontrati gli stessi problemi evidenziati presso i servizi trasfusionali con circa il 6% dei laboratori che non li ha identificati come reattivi campioni contenenti una bassa concentrazione di antigene (0,20 U/PEI/ml).

Riproducibilità. - La riproducibilità, valutata come sopra indicato, è stata valutata per i soli campioni positivi per anti-HIV-1. Essa risulta soddisfacente sia fra saggi diversi (*between-assay*) che all'interno dello stesso saggio (*within-assay*), risultando in media rispettivamente del 93-96% e del 98-99%.

Analisi degli errori. - Sono stati presi in considerazione gli stessi tipi di errore descritti precedentemente. In particolare, a causa di errori di trascrizione o di calcolo, sono risultati costantemente, per ogni invio di campioni, non valutabili alcuni saggi (da un valore minimo dello 0% ad uno massimo del 4,1%, con un valore medio intorno al 2%) anche se classificati correttamente.

Convegno congiunto sull'attività del programma. - Il 16 aprile 1997 si è tenuto a Roma, presso l'Istituto Superiore di Sanità, il workshop relativo ai risultati dei saggi effettuati negli anni 1995-1996. Tale workshop ha previsto la partecipazione dei responsabili dei laboratori diagnostici e dei servizi trasfusionali che aderiscono al programma.

Durante tale riunione sono stati presentati e discussi collegialmente i risultati cumulativi ottenuti, analizzati i problemi emersi sulla verifica della qualità in uso per questi saggi sierologici presso gli ST e gli LD, confrontati i dati italiani con quelli simili ottenuti da colleghi francesi e, come di consueto, sono stati anche recepiti suggerimenti e proposte per il miglioramento del programma.

2.1.6 Allestimento e sviluppo di modelli animali finalizzato alla ricerca sul vaccino per l'AIDS

Il progetto, finalizzato allo sviluppo di un vaccino anti-AIDS, è stato istituito nel 1990 come progetto autonomo. Le ricerche sono state concentrate su due modelli animali (FIV-felino, SIV-scimmie Macaca). Il modello FIV-felino è stato impiantato e sviluppato presso l'Università di Pisa dove si è costituito un gruppo articolato comprendente esperienze virologiche, infettivologiche, veterinarie e anatomo-patologiche. Il modello SIV-macaco è stato impiantato e sviluppato presso l'ISS (sede della sperimentazione sugli animali) in collaborazione con altri centri universitari con esperienze virologiche, immunologiche e anatomo-patologiche.

Sin dalla istituzione del progetto e per i successivi rinnovi, si è ritenuto che l'attività di ricerca relativa potesse solo configurarsi come un tipo di "azione coordinata di ricerca" che, per il suo carattere particolarmente avanzato e per le limitazioni derivate dalla necessità di utilizzare strutture idonee per la stabulazione degli animali infetti, potesse essere affrontata al meglio da un ristretto numero di unità operative, in grado di operare in stretta collaborazione, sotto la supervisione di un responsabile scientifico.

Ad esempio, il modello SIV-macaco ha richiesto e richiede per la sua complessità e rilevanza l'apporto di esperienze e forze professionali diverse per assicurare che, per ogni animale utilizzato, vengano studiati tutti i parametri (infettivologici, virologici, immunologici, patologici, ecc.) suscettibili di fornire le informazioni necessarie per la valutazione dello studio. In vista delle risorse investite e per uniformità con altri progetti di ricerca finalizzati dell'Istituto, nel 1995 il Direttore dell'Istituto ha ritenuto importante

affiancare al responsabile scientifico del progetto un Comitato scientifico consultivo per la valutazione dell'attività in corso (trattasi perlopiù di esperimenti pluriennali) e per fornire utili indicazioni per lo sviluppo del progetto e per la ripartizione dei finanziamenti fra i vari gruppi partecipanti. Il Comitato si è riunito nel 1996 e nel 1997, anche alla presenza dei gruppi partecipanti, approvando le sperimentazioni proposte, la ripartizione dei finanziamenti e le relazioni intermedie.

Nel corso del 1997, a seguito della ristrutturazione dei progetti di ricerca AIDS, e in particolare a seguito della suddivisione dei finanziamenti dei progetti di ricerca AIDS fra fondi intramurali ed extramurali, le attività relative al progetto "Sviluppo di modelli animali" sono confluite nei progetti generali, separando la parte svolta all'interno dell'ISS da quelle extramurali.

Obiettivi

Il progetto di ricerca si proponeva di mettere a punto e di studiare modelli animali di immunodeficienza acquisita da lentivirus che riproducessero il più fedelmente possibile l'infezione da HIV in animali. Ciò al fine di: individuare gli approcci più idonei per allestire vaccini innocui ed efficaci contro i lentivirus immunodepressivi; chiarire i meccanismi di immunità protettiva nei confronti dei lentivirus; chiarire i meccanismi patogenetici alla base dell'infezione e della progressione della malattia.

Attività svolta e risultati più significativi ottenuti

Modello FIV-felino. - FIV è uno dei modelli animali di AIDS più interessanti in quanto consente un'analisi dettagliata e agevole di un lentivirus immunodepressivo nel suo ospite naturale. In particolare, si

presta a: 1) chiarire i meccanismi di immunità protettiva nei confronti dei lentivirus; 2) verificare l'entità e l'importanza patogenetica delle variazioni genetiche e antigeni cui vanno incontro i lentivirus; 3) valutare l'efficacia di farmaci diretti contro i lentivirus; e soprattutto 4) individuare gli approcci più idonei per allestire vaccini innocui ed efficaci contro i lentivirus immunodepressivi. Da notare anche che FIV è un lentivirus notevolmente diffuso nelle popolazioni di gatti domestici e selvatici, nelle quali provoca notevoli danni alla salute. Lo studio approfondito di FIV può quindi portare notevoli benefici anche al suo ospite naturale.

Messa a punto del modello. - Questa fase ha comportato l'allestimento di appositi stabulari, l'ampliamento dei laboratori, il reclutamento e l'addestramento di nuovo personale, l'acquisizione di nuove apparecchiature, lo sviluppo di sistemi cellulari appropriati, l'isolamento, caratterizzazione e adattamento alla crescita *in vitro* di ceppi virali locali. In particolare, è stato sviluppato un ceppo di virus a rapida azione patogena *in vivo*.

Sviluppo di nuove tecniche e reagenti. - Sono state sviluppate e applicate su vasta scala tecniche per la determinazione degli anticorpi neutralizzanti. E' stato studiato il ruolo svolto dalla variante virale, dal sistema ospite e da numerose altre variabili nella sieroneutralizzazione. Sono stati sviluppati e prodotti anticorpi monoclonali contro la p24 di superficie di FIV che sono stati impiegati per la messa a punto di test di rilevazione del virus e dei relativi anticorpi. Sono stati sviluppati e caratterizzati anticorpi monoclonali anti-gp120 e anti-gp41. Sono state messe a punto ed estesamente impiegate tecniche di PCR verso regioni diverse del genoma di FIV, sia qualitative che quantitative, sia universali che ceppo-specifiche. Sono stati effettuati numerosi tentativi di sviluppare tecniche molecolari

(PCR *in situ*) per ottenere informazioni precise circa la localizzazione del virus, fino ad oggi con risultati poco soddisfacenti. Sono state messe a punto e utilizzate per la valutazione di vaccini tecniche in linfoproliferazione per rilevare le risposte immuni cellulo-mediate verso FIV e suoi componenti.

Sviluppo di vaccini. - In premessa, è importante sottolineare i criteri adottati per impostare gli esperimenti di vaccinazione: 1) impiego di virus di fresco isolamento per la preparazione degli immunogeni; 2) intervallo di alcuni mesi tra ultima dose di vaccino e challenge; 3) utilizzo di virus *ex vivo* per sfidare gli animali vaccinati; 4) follow-up degli animali sfidati mediante ricerca dell'infezione con tutte le tecnologie disponibili (isolamento virale qualitativo e quantitativo, PCR qualitativa e quantitativa, sierologia, sottopopolazioni linfocitarie); e 5) periodi di follow-up molto prolungati (12-24 mesi). La scelta di tali criteri, che hanno l'inconveniente di richiedere tempi lunghi, è stata dettata dall'esigenza di riprodurre quanto si verifica in condizioni naturali di infezione con la massima fedeltà realizzabile in laboratorio, evitando peraltro anche gli artefatti che si possono verificare allorché si usano virus propagati *in vitro*.

Sono stati sperimentati i seguenti tipi di vaccino:

a) *Vaccino a cellule infettate fissate*. Un vaccino di questo tipo ha dato buoni risultati, avendo protetto contro l'infezione tutti gli animali vaccinati allorché questi sono stati sfidati dopo 4 mesi dall'ultima dose di vaccino con il virus omologo acellulare somministrato per via endovenosa. E' ancora in corso la valutazione dell'efficacia contro virus omologo ed eterologo associato a cellule, la durata dello stato di protezione e l'efficacia di periodici richiami vaccinali per mantenere l'immunità protettiva.

b) *Vaccino a virus intero inattivato o split.* Questi esperimenti hanno lo scopo di individuare immunogeni protettivi meno complessi di quello utilizzato nello studio di cui al punto a). Anche in questi esperimenti, per la preparazione dei vaccini si è utilizzato un isolato recente di FIV (ceppo Pisa-M2) cresciuto su cellule MBM (cellule con A e IL 2 dipendenti). Il virus è stato concentrato mediante ultrafiltrazione, purificato in gradienti, trattato o meno per dissociarne la struttura e inattivato o meno con paraformaldeide. Gli animali vaccinati con ambedue i tipi di vaccino hanno sviluppato una buona risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata e sono stati sfidati con virus omologo per via endovenosa o mucosa (vaginale) quattro mesi dopo l'ultima dose di vaccino. Gli animali sono ancora in follow-up da alcuni mesi.

c) *Vaccini costituiti da peptidi sintetici.* In studi precedenti si era tentato senza successo di vaccinare utilizzando un peptide derivato dalla regione V3 della glicoproteina SU di FIV che contiene epitopi lineari neutralizzanti *in vitro*. Recentemente sono state individuate ulteriori porzioni delle glicoproteine SU e TM di FIV che sembrano essere coinvolte nelle interazioni virus-cellule ospiti. E' in corso la valutazione di una loro possibile azione protettiva. Infine, mediante sviluppo di monoclonali capaci di neutralizzare ceppi primari di FIV, è in corso lo studio per individuare epitopi protettivi configurazionali che servano poi per individuare mimotopi mediante "fishing" in "random libraries" di peptidi sintetici.

d) *Vaccino attenuato.* Il ceppo Petaluma di FIV prodotto da cellule FL4 persistentemente infettate non si può considerare sufficientemente attenuato per essere utilizzabile come vaccino ma presenta un grado di attenuazione tale da consentire inte-

ressanti sperimentazioni orientative. Sono in corso esperimenti per appurare se l'infezione persistente con FIV Petaluma (181 e 381 passaggi) *in vitro* può proteggere contro l'infezione o contro la malattia indotta da isolati primari omologhi o eterologhi di FIV.

e) *Impiego su campo di un vaccino dimostratosi efficace contro l'infezione sperimentale.* E' in corso di valutazione l'opportunità e la fattibilità di un primo trial sul campo del vaccino a cellule infettate fissate di cui al punto a), che si è dimostrato altamente efficace in condizioni di laboratorio. Gli animali da vaccinare appartengono ad un affollato gattile con basso livello di salubrità e pertanto sono ad alto rischio di infezione.

Modello SIV in Macaca fascicularis. - Come è noto, solo lo scimpanzè e il gibbono possono essere infettati con l'HIV-1. Tuttavia, a differenza dell'uomo, lo scimpanzè infettato non sviluppa l'AIDS anche dopo un prolungato periodo di latenza. La sperimentazione con lo scimpanzè presenta inoltre le note limitazioni per ragioni etiche, economiche e di disponibilità.

Le scimmie del genere *Macaca (mulatta e fascicularis)* risultano sensibili al SIV e, dopo un relativamente breve periodo di latenza, sviluppano una sintomatologia molto simile all'AIDS, incluse le caratteristiche modificazioni immunologiche e l'infezione a livello cerebrale. La sperimentazione con i macachi comporta meno indagini rispetto a quella con gli scimpanzè per i minori costi e per le minori difficoltà di stabulazione, allevamento e sperimentazione. Inoltre è possibile eseguire sperimentazioni su un numero maggiore di animali e ottenere quindi risultati scientificamente più attendibili.

Comune svantaggio dei due modelli di AIDS in primati è il fatto che l'infezione

può essere acquisita solo sperimentalmente, o per inoculazione endovenosa o per applicazioni sulle mucose.

Il modello SIV-macaco risulta indispensabile in vari campi di ricerca sull'AIDS, in particolare per lo sviluppo di un vaccino, per studi patogenetici, per approcci terapeutici e per lo studio dei meccanismi di trasmissione materno-infantile dell'infezione.

Messa a punto del modello. - Questa fase ha comportato l'allestimento di appositi stabulari, l'ampliamento dei laboratori, il reclutamento e l'addestramento di nuovo personale, l'acquisizione di nuove apparecchiature, lo sviluppo delle metodiche per l'isolamento e la quantificazione della carica virale, la valutazione delle risposte anticorpali e cellulari all'infezione e il monitoraggio dello stato di infezione e malattia degli animali.

Sviluppo di vaccini. - In questo settore sono state condotte le seguenti ricerche:

a) *Partecipazione ad uno studio europeo sulla valutazione di vaccini inattivati nel modello SIV.* Tale studio ha interessato 8 centri dislocati in 6 paesi afferenti all'UE ed è stato effettuato utilizzando 96 animali (macachi), rappresentando uno dei saggi più completi di vaccinazione in questo modello effettuati nel mondo. E' stata valutata l'efficacia di diverse formulazioni antigeniche di SIV incorporate in diversi adiuvanti. Si è dimostrato che vaccini allestiti con virus inattivati con formalina o dissociati in subunità sono in grado di conferire protezione dall'infezione con SIV. Un risultato completamente inatteso emerso da questo studio è stata l'osservazione che antigeni cellulari incorporati durante la propagazione del SIV in cellule umane possono contribuire in maniera significativa alla risposta immunoprotettiva. L'interpretazione di questo fenomeno, che di fatto ha smorzato l'entusiasmo sulla possibilità di ottenere un vaccino protettivo per l'HIV secondo questo schema,

è ancora oggetto di studio e può riflettere la presenza di omologie strutturali fra componenti cellulari e componenti virali.

b) *Il saggio IVAP (produzione spontanea di anticorpi in vitro) come marcatore di protezione in scimmie vaccinate.* E' stato evidenziato come in scimmie infettate con SIV o risultate non protette in esperimenti di vaccinazione, ma non in scimmie immunizzate e protette, si poteva dimostrare una produzione spontanea di anticorpi *in vitro*. Questo dato potrebbe rivelarsi importante per monitorare la protezione di soggetti vaccinati nelle sperimentazioni nell'uomo con vaccini anti-HIV-1.

c) *Effetto della vaccinazione con SIV intero inattivato in scimmie gravide e trasferimento e persistenza degli anticorpi nei neonati.* Non è stato osservato alcun effetto indesiderato sulla maturazione fetale durante l'immunizzazione delle scimmie gravide. Questo dato può essere importante per un possibile programma di vaccinazione in donne in età fertile. Gli anticorpi anti-SIV, compresi quelli neutralizzanti, sono trasferiti passivamente ai neonati e scompaiono dai due ai sei mesi dalla nascita.

d) *Valutazione dell'efficacia di un trattamento vaccinoterapico con SIV intero inattivato in scimmie persistentemente infettate con SIV.* Lo scopo è stato quello di verificare se il trattamento con adeguati immunogeni, stimolando una risposta anamnestiche nella scimmia infetta, fosse in grado di modificare la carica virale e influire sulla progressione dell'infezione. Il trattamento vaccinoterapico ha indotto nelle scimmie infette una stimolazione delle cellule T con concomitante aumento della carica virale nei linfociti infetti, senza influire sull'evoluzione della malattia. Alla luce di questi risultati, va esaminata con cautela la possibilità di intervenire con preparazioni vaccinali simili negli individui infetti con HIV.

e) *Vaccinazione con virus attenuato con delezione nel gene nef*. È stato effettuato uno studio europeo, per la valutazione dell'efficacia dell'inoculo di virus vivo attenuato nell'indurre una protezione sterilizzante o un ritardo nell'evoluzione dell'infezione. In tale studio sono stati interessati 8 centri, di 6 paesi afferenti all'UE (2 tedeschi, 2 inglesi, 1 francese, 1 svedese, 1 olandese e il gruppo dell'ISS). Scopo dello studio era di valutare se l'inoculo di una variante non virulenta di SIV (SIV/C8), che presenta una delezione nel gene *nef*, potesse in qualche modo proteggere le scimmie da una successiva esposizione ad un ceppo virale non attenuato. Inoltre, per poter verificare se l'eventuale protezione non fosse dovuta ad una protezione "omologa", il progetto prevedeva di utilizzare come "challenge" diversi ceppi virali non attenuati di diversa origine (cresciuti in cellule umane o in cellule di scimmia), rappresentanti sia popolazioni eterogenee che cloni molecolari di SIV.

I dati dell'ISS, come pure quelli di altri gruppi, hanno confermato l'efficacia del virus vivo attenuato nell'indurre una protezione. Le scimmie, pur rimanendo persistentemente infettate con il virus attenuato, sono risultate protette dalla superinfezione con un clone molecolare di SIV e da una successiva (dopo due anni) superinfezione con altro ceppo di SIV patogeno. Anche se tale approccio vaccinale, che si basa sull'uso di un virus attenuato ma competente per la replicazione, può con difficoltà essere applicabile all'uomo, tuttavia esso si presenta di estrema importanza perché può permettere di studiare i possibili meccanismi correlati alla protezione.

f) *Immunizzazione con DNA: valutazione dell'efficacia nel prevenire o ritardare l'infezione da SIV*. Sono state recentemente

sviluppate tecniche di immunizzazione che prevedono l'introduzione, generalmente tramite inoculo intramuscolo, di costrutti di DNA direttamente nei tessuti. L'inoculo diretto di uno o più geni di un agente patogeno può essere considerato alla stregua di un vaccino attenuato, poiché la sintesi della/e proteine virali avviene direttamente nell'ospite; a tale riguardo, si possono formulare vettori di espressione contenenti sia singoli geni che un insieme di regioni virali diverse, la cui espressione *in vivo* induce una risposta umorale (es. anticorpi neutralizzanti), o una risposta cellulomediata (es. attività citotossica), oppure entrambe le risposte contemporaneamente. Questo approccio permette tra l'altro di ottenere informazioni sulle regioni del genoma virale, importanti per l'ottenimento di una protezione, e sui meccanismi interessati.

L'obiettivo che ci si è proposti era quello di verificare nella scimmia l'efficacia protettiva nei confronti del "challenge" con ceppi di SIV patogeni di costrutti contenenti geni *env* o *gag* di SIVmac239 inoculati intramuscolo o per via mucosale. A tal scopo sono stati preparati i costrutti retrovirali con l'impiego di opportuni promotori, quali il CMV e, prima di passare all'inoculazione delle scimmie, è stata valutata, in un sistema murino (Balb/c), la capacità di tali costrutti di esprimere proteine di SIV in grado di indurre una risposta umorale e/o cellulomediata.

g) *Immunizzazione per via mucosale con un vaccino costituito da Streptococcus gordonii esprime proteine eterologhe*. Per valutare l'efficacia di un vaccino, utile per prevenire la trasmissione per via sessuale dell'HIV/SIV, è stata scelta la via vaginale come via di somministrazione dell'immunogeno. Infatti i vaccini somministrati per

via mucosale presentano una serie di vantaggi quali la facilità di somministrazione, la non invasività e la possibilità per l'antigene di venire direttamente a contatto con il tessuto linfatico-associato alla mucosa, che solitamente rappresenta la porta di ingresso dei vari patogeni, siano essi di natura batterica che virale.

Gli antigeni somministrati per via mucosale sono però solitamente poco immunogenici e fra i vari approcci studiati per risolvere questo problema si è ricorsi all'utilizzo di batteri per veicolarli. In un primo esperimento pilota, eseguito in collaborazione con l'Università di Cagliari, è stata valutata la possibilità di stimolazione del sistema immune depositando nella mucosa vaginale di *M. fascicularis* un vettore vivo, *Streptococcus gordonii*, la porzione V3 della proteina *env* di HIV-1 o, come controllo, esprime la proteina M7 di HPV16 (human papilloma virus). I risultati hanno dimostrato che tale sistema di "delivery" è stato capace di indurre una risposta immune specifica sia a livello locale che sistemico.

h) *Studio dell'insorgenza di linfomi in scimmie sperimentalmente infettate con SIVmac251*. L'aumento dell'incidenza di linfomi di diverso tipo in pazienti infettati con HIV è un dato riportato in letteratura. Finora non è stata evidenziata nessuna diretta correlazione tra infezione da HIV e processo tumorigenico. Tuttavia si può ipo-

tizzare un ruolo multifattoriale esercitato da HIV (attivazione policlonale delle cellule B in presenza o in assenza di EBV, rilascio di varie citochine o di altri fattori, oltre al deficit del sistema immune).

Nel corso degli studi condotti dal gruppo dell'ISS, per valutare l'efficacia di preparazioni vaccinali nel prevenire o ritardare l'infezione da SIV in *Macaca fascicularis*, sono stati finora osservati 5 casi di linfomi. Dei 5 tumori osservati e diagnosticati *post-mortem*, 4 sono stati classificati come linfomi "high grade" non-Hodgkin's con fenotipo B, e uno è stato classificato come un linfoma non Hodgkin's a grandi cellule con fenotipo T. In alcuni casi (3 linfomi con fenotipo B) si è osservata la presenza HVMF-1 (*Herpes virus della M. fascicularis*), mentre in nessun caso si è avuta evidenza di infezione con EBV, STLV e HHV8. Il dato interessante è la presenza di SIV in 2 linfomi B e nell'unico linfoma T. Il provirus integrato e la presenza di virus competente per la replicazione è stato finora rilevato solo in quest'ultimo caso. Tali risultati fanno ipotizzare che l'insorgenza dei linfomi in scimmie sperimentalmente infettate con SIV può non essere associato alla presenza di virus coinfectanti (HHV8 in particolare) o ad una severa immunodeficienza. Interessante sembra essere l'osservazione della presenza di SIV in tali tumori, ma un suo ruolo nel processo linfomagenico rimane ancora da chiarire.

2.1.7 Progetto terapia antivirale AIDS

Il progetto di ricerca "Terapia antivirale dell'infezione da HIV" (PTA) è stato istituito, in seguito al parere della Commissione nazionale AIDS (seduta del 29 gennaio 1991), come progetto autonomo da affiancare al già esistente "progetto nazionale di ricerca AIDS", nell'ambito delle attività di lotta all'AIDS coordinate e finanziate dall'ISS.

Le motivazioni di base per l'istituzione del PTA riguardavano la necessità di disporre di una modalità scientificamente rigorosa per selezionare, finanziare e coordinare ricerche riguardanti terapie dirette contro l'infezione da virus HIV, in ragione delle particolari caratteristiche scientifiche, bioetiche, organizzative e di valutazione di questo settore della ricerca anti-HIV.

Il PTA rappresenta l'equivalente italiano di quanto realizzato da altri paesi particolarmente impegnati nella lotta contro l'AIDS, quali gli Stati Uniti (con l'ACTG - AIDS Clinical Trials Group, dei NIH - National Institutes of Health), il Regno Unito (con il Medical Research Council) e la Francia (con l'INSERM/ANRS), che coordinano e finanziano, anche a livello di istituzioni pubbliche di ricerca, le sperimentazioni cliniche in questo settore. Il progetto si avvale di un Comitato scientifico, composto da membri della Commissione nazionale AIDS, nominato e presieduto dal Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità.

Obiettivi

Gli obiettivi principali del PTA riguardano essenzialmente lo svolgimento di studi clinici, farmacologici e virologici nel settore dell'infezione da HIV, classificabili in tre grandi gruppi:

a) ampi studi clinici multicentrici per la valutazione clinica degli antiretrovirali a carattere sia nazionale che internazionale (questi ultimi in collaborazione con altri organismi di ricerca europei);

b) studi "pilota" di dimensioni più ridotte per la valutazione preliminare, spesso a carattere strettamente virologico, di nuove combinazioni di farmaci, che rappresentano la base per il disegno di più ampie ricerche;

c) studi e ricerche a carattere clinico-laboratoristico per la valutazione e il controllo di qualità multicentrico delle metodiche immunologiche e virologiche essenziali per la valutazione delle terapie.

Dal 1988 ad oggi, oltre 100 centri clinici su tutto il territorio nazionale hanno complessivamente partecipato alle diverse attività multicentriche. Le varie attività svolte riflettono pienamente l'evoluzione del trattamento dell'infezione nel corso dell'ultimo decennio. Si è così passati da un'attività iniziale di farmacovigilanza nazionale sulla zidovudina (il primo antiretrovirale disponibile e per un certo periodo l'unico), che ha peraltro consentito anche una valutazione indiretta di efficacia del farmaco, al disegno e alla conduzione di studi clinici controllati che inizialmente confrontavano singoli farmaci in monoterapia, e successivamente regimi di doppia e tripla combinazione, per giungere infine ai recenti studi a carattere strategico mirati a definire le migliori strategie per una soppressione il più possibile duratura della replicazione di HIV, e alla costituzione di ampie basi di dati osservazionali su pazienti in trattamento con gli attuali potenti regimi terapeutici di combinazione, nell'ottica di identificare i regimi più efficaci nel realizzare un significativo aumento di sopravvivenza.

Dal punto di vista delle modalità di svolgimento degli studi, è indubbio che le atti-

vità di monitoraggio e di coordinamento degli studi, oltre a costituire e a rafforzare nel tempo un'importante rete collaborativa che comprende ormai tutti i principali centri clinici italiani, hanno prodotto lo svolgimento in maniera uniforme delle sperimentazioni (in accordo dalla loro istituzione con le procedure introdotte dalle norme di buona pratica clinica), permettendo inoltre l'accesso ad importanti studi internazionali. Fra le ricadute in termini di contributi di conoscenza, oltre alla definizione di efficacia e tossicità dei vari regimi terapeutici, va ricordata la definizione di alcune correlazioni di carattere più strettamente virologico che legano fra loro vari parametri replicativi e di infettività che venivano esaminati nell'ambito degli studi, contestualmente alla valutazione di efficacia clinica.

Risultati ottenuti

Malgrado tutte le ricerche cliniche, a differenza delle ricerche di laboratorio, abbiano in genere bisogno di più anni per arrivare alla loro naturale conclusione, la maggior parte dei progetti del PTA ha prodotto risultati di grande rilevanza scientifica, molti dei quali pubblicati o in corso di pubblicazione su prestigiose riviste internazionali. Il prestigio acquisito dal progetto è anche testimoniato dalle continue richieste di collaborazione internazionale che giungono da organismi di ricerca quali i National Institutes of Health degli Stati Uniti e il Medical Research Council inglese.

Tra le ricerche portate avanti spiccano quelle legate a collaborazioni internazionali, come il grande studio europeo DELTA sulle combinazioni di farmaci anti-HIV, che ha impegnato 21 centri clinici italiani per oltre 3 anni, e l'attuale studio multicentrico nazionale sugli inibitori delle pro-

teasi in pazienti con malattia avanzata da HIV.

Fra le principali tematiche oggetto delle ricerche coordinate vanno citate: la definizione della potenziale efficacia del trattamento dell'infezione acuta da HIV; la valutazione di strategie terapeutiche con anti-retrovirali in combinazioni multiple o con nuovi antivirali (come gli inibitori delle proteasi); gli studi sulla terapia pediatrica dell'infezione da HIV, con il nostro paese che coordina importanti studi multicentrici europei (Progetto "Penta"); lo studio sull'impatto dell'immunoterapia con proteine di HIV (gp120) in soggetti con infezione da HIV e funzione immune relativamente conservata; le indagini a carattere molecolare sulla variabilità genetica dell'HIV come effetto della pressione indotta dal trattamento antiretrovirale; la definizione del significato clinico della resistenza agli antiretrovirali; la definizione dei rapporti che legano fra loro vari parametri virologici (carica virale, resistenza, fenotipo SI/NSI) in relazione alle varie fasi della malattia, al tipo e al periodo di trattamento antiretrovirale e alla sua reale efficacia clinica; la definizione di nuovi marcatori virologici di efficacia che risultino più validi di quelli attualmente disponibili.

Il progetto non ha utilizzato, negli anni passati, grazie ad una politica di accurata selezione, basata su aspetti di priorità scientifica delle proposte pervenute, tutti i finanziamenti che gli erano stati attribuiti, per cui è in grado di disporre attualmente di una riserva finanziaria per l'eventuale effettuazione di nuovi studi e ricerche. Un nuovo grande progetto multicentrico è stato avviato durante l'estate del 1996. Si tratta di uno studio che riguarda l'uso dei nuovi farmaci anti-HIV, detti inibitori delle proteasi, su pazienti in fase avanzata di ma-

lattia. Questo studio, che oltre alla grande rilevanza scientifica presenta una notevole valenza sociale essendo in attesa della registrazione europea di questi farmaci, fa accedere ai più avanzati trattamenti un numero elevatissimo di pazienti italiani, viene attualmente svolto presso 80 centri clinici distribuiti presso tutto il territorio nazionale.

Progetti di ricerca italiani

Nel corso del triennio 1995-1997 il PTA ha finanziato, su proposta di ricercatori italiani, i seguenti progetti di ricerca, valutandone periodicamente i risultati e contribuendo all'analisi dei dati ottenuti:

- Studio multicentrico comparativo aperto randomizzato per la valutazione di tollerabilità ed efficacia dell'associazione ddI - IFN-alfa-2b versus ddI in monoterapia nell'infezione da HIV (ISS/PTA/192001).

- Efficacia della didesossinosina nella encefalite da HIV e nel quadro clinico correlato (AIDS dementia complex): studio pilota (ISS/PTA/192009).

- Trattamento dell'infezione acuta da HIV (ISS/PTA/192039).

- Potenziale attività antiretrovirale della pentossifillina mediata dalla riduzione del TNF in pazienti affetti da AIDS (ISS/PTA/192003).

- Progetto VaxSyn "Valutazione della vaccinazione terapeutica con GP160 di pazienti con infezione da HIV".

- Studio comparativo di efficacia e tollerabilità di due diversi schemi di terapia con dideossinosina (ddI) in bambini con infezione da HIV sintomatica intolleranti o non rispondenti alla zidovudina (ISS/PTA/192022) e Studio sulla resistenza ai nucleosidi nell'infezione da HIV in età pediatrica (ISS/PTA/94B04).

- Studio multicentrico per la valutazione: 1) della efficacia e tollerabilità delle

associazioni ZDV + IFN alfa + timosina alfa 1 e 2) ZDV + IFNA, in confronto a monoterapia di riferimento con ZDV in soggetti con infezione da HIV (ISS/PTA/192013).

- Zidovudina + metotrexate nel trattamento dei linfomi non-Hodgkin HIV-correlati (ISS/PTA/192034).

- Studi clinici controllati multicentrici europei sull'infezione da HIV in età pediatrica [Penta 1/5] (ISS/PTA/9602 multicentrico).

- Studio sulla risposta citochinica in corso dell'infezione da HIV (ISS/PTA/94A03).

- Studio multicentrico per la standardizzazione della valutazione delle sotto-popolazioni linfocitarie e per coordinare il controllo di qualità su base nazionale nel monitoraggio della terapia della malattia da HIV (ISS/PTA/94B01).

- Ottimizzazione e standardizzazione delle tecniche virologiche a supporto della sperimentazione sui farmaci. (ISS/PTA/94B02-multicentrico).

- Studio delle combinazioni di farmaci antiretrovirali con la metodologia degli "small intensive trials" (ISS/PTA/94B03).

- Programma di ricerca sugli aspetti farmacocinetici di composti ad azione anti-HIV.

- Farmaci antiretrovirali in gravidanza: sorveglianza degli effetti sulla madre, il feto e il neonato.

Progetti coordinati dall'Istituto Superiore di Sanità

Studio europeo DELTA. - Questo studio multinazionale (valutazione di doppie combinazioni di analoghi nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa), di grandi dimensioni (oltre 3000 pazienti complessivi di cui circa 300 in Italia) e di grande importanza per la definizione delle strategie terapeutiche

(dimostrazione della superiorità clinica delle doppie combinazioni di analoghi nucleosidici sulla monoterapia con AZT), si è chiuso nel settembre 1995 ed è stato pubblicato nel 1996. Le terapie valutate, rispetto alla monoterapia con AZT, erano AZT/ddI e AZT/ddC. I pazienti, sintomatici o comunque con $CD4 < 350/mm^3$, sono stati stratificati in due gruppi: precedentemente trattati con AZT e "naïve". I risultati di un follow-up mediano di 30 mesi hanno dimostrato che, nel secondo gruppo, entrambe le combinazioni farmacologiche sono superiori alla monoterapia in termini di sopravvivenza; nei soggetti già trattati con AZT, invece, questo risultato si ottiene solo con l'aggiunta di ddI. La valutazione del follow-up a lungo termine di tutti i pazienti randomizzati è ancora in corso ed è quindi prevista un'ulteriore valutazione di efficacia con un follow-up più lungo.

Studio clinico ISS 047 (valutazione comparativa di combinazioni di inibitori della trascrittasi inversa di HIV). - Lo studio ISS 047 è uno studio multicentrico randomizzato, controllato in doppio cieco con placebo per la valutazione comparativa *in vivo* della tripla combinazione ZDV+ddI+nevirapina versus ZDV+ddI in pazienti HIV-1 positivi con malattia avanzata (AIDS o cell. $CD4 < 200/mm^3$) e nessun precedente trattamento con antiretrovirali. Obiettivo dello studio è la valutazione comparativa di trattamenti basati su combinazioni di inibitori della trascrittasi inversa (AZT, ddI, nevirapina) in relazione a: 1) capacità di inibizione *in vivo* della replicazione virale, valutata attraverso tecniche quantitative per la determinazione dell'HIV-RNA; 2) possibili variazioni in alcune caratteristiche fenotipiche di aggressività (ceppi sinciziogeni) e di sensibilità agli antiretrovirali; 3) correlazione fra carica virale, fenotipo virale e

sviluppo di resistenza ai farmaci impiegati e ruolo dei suddetti parametri nel condizionare la risposta al trattamento; 4) tossicità dei due regimi terapeutici. Oltre alla valutazione principale di efficacia sono state quindi analizzate numerose correlazioni fra i vari parametri virologici studiati (carica virale e resistenza, fenotipo, titolo dell'infettività in $TCID_{50}$, ecc.). Sono stati arruolati 71 pazienti in 12 diversi centri clinici. È stata svolta un'analisi intermedia nel dicembre 1996 in seguito alla quale la fase in cieco del protocollo è stata interrotta per la presenza di differenze significative di risposta in termini di $CD4$ e di HIV-RNA, che dimostravano la superiorità della terapia con tre farmaci.

Studio clinico ISS-IP1 (valutazione comparativa di inibitori della proteasi di HIV). - Lo studio ISS-IP1 è un ampio studio nazionale multicentrico sull'impiego di inibitori della proteasi in pazienti con malattia da HIV in fase avanzata ($CD4 < 50/mm^3$) e precedente trattamento antiretrovirale. Obiettivo di questo studio è definire le caratteristiche di tollerabilità e sicurezza di due inibitori delle proteasi (ritonavir e indinavir) in pazienti con infezione avanzata da HIV ($CD4$ inferiori a $50/mm^3$) e precedente trattamento antiretrovirale. Lo studio ha grandi dimensioni, coinvolgendo circa 80 centri clinici, distribuiti su tutto il territorio nazionale, per un totale di oltre 1300 pazienti randomizzati (a cui vanno aggiunti circa 100 pazienti che non ricevevano inibitori delle proteasi per scelta personale o per condizioni interferenti), seguiti per un anno. La chiusura dello studio è prevista per la fine del 1997 e l'analisi finale entro il 1998. Dati preliminari di tossicità saranno forniti entro il 1997 sulla base di un'analisi intermedia su dati al marzo 1997. Benché non centrato sulla valutazione di efficacia, lo

studio esaminerà anche dati di progressione verso l'AIDS e la sopravvivenza. La mole di dati è notevole anche in termini di eventi segnalati: oltre 1000 segnalazioni di eventi avversi, alcune centinaia di eventi fra nuove patologie AIDS e segnalazioni di decesso. Oltre ai dati clinici e alla valutazione della risposta CD4, lo studio prevede in sotto-

gruppi di pazienti la valutazione della risposta in termini di HIV-1 RNA (sono stati raccolti nei centri clinici un totale di oltre 1000 campioni), valutazioni di farmacocinetica e studi di interazione con altri farmaci (attualmente in corso), nonché la valutazione della qualità della vita mediante questionari specifici.

2.1.8 Progetto AIDS-Uganda

La pandemia di AIDS ha raggiunto livelli catastrofici investendo significative porzioni della popolazione in molti paesi, oltre a diffondersi rapidamente in zone precedentemente non colpite a livello epidemico. Gli sforzi internazionali della ricerca specializzata di sanità pubblica sono tesi alla prevenzione. Tra i settori di investimento per la prevenzione, fondamentale è quello della prevenzione biologica attraverso i vaccini preventivi e le immunoterapie. La ricerca sui vaccini anti-AIDS riconosce, quali fondamentali settori, lo studio della storia naturale dell'infezione, la caratterizzazione dell'agente patogeno e la risposta immunitaria all'infezione.

Con uno sforzo unico nella storia della sanità pubblica, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) prima e le Nazioni Unite (UNAIDS) hanno avviato, attualmente, programmi di ricerca che coordinino gli sforzi mondiali nel settore concentrandoli in aree ad alta incidenza di infezione. Il nostro paese si inserisce con il presente progetto in tali programmi con un contributo originale italiano.

L'attività di ricerca sul progetto Uganda si inserisce in un programma di cooperazione tra Italia e Uganda per un sostegno alla lotta all'AIDS. Questo programma si avvale di una componente di sanità pubblica, sostenuta da un finanziamento del Ministero degli Affari Esteri, per metà in gestione locale diretta e per l'altra metà affidato all'ISS con apposita convenzione e di una componente di ricerca, interamente finanziata dai fondi AIDS-ISS e gestita dai Laboratori di Epidemiologia e biostatistica e di Virologia dell'Istituto.

Il progetto offre un'importante occasione di ricerca: si tratta di una base operativa

italiana in Uganda per un lungo periodo (8-10 anni). Infatti il sito di ricerca presso l'Ospedale "St. Mary's Lacor" di Gulu permette di condurre ricerche epidemiologiche, virologiche, microbiologiche e immunologiche sull'HIV oltre a studi di valutazioni di interventi preventivi, mentre il sito di ricerca presso l'Ospedale "St. Francis Nsambya" di Kampala è già attivo per la conduzione di studi clinici controllati. Sia la componente epidemiologica che la componente virologica e immunologica si avvantaggiano dell'inserimento negli appositi network OMS, che comprendono i migliori gruppi mondiali del settore.

Il progetto si compone di 3 parti.

Progetto di ricerca di lotta all'AIDS in Uganda. - Il sito di ricerca del progetto è localizzato presso l'Ospedale "St. Mary's Lacor" a Gulu, principale centro ospedaliero del nord Uganda con 446 posti letto.

Il progetto si pone i seguenti obiettivi:

- 1) istituire un sito per la ricerca epidemiologica, virologica e immunologica dell'HIV e per la valutazione di interventi preventivi;
- 2) isolare e caratterizzare i ceppi del virus dell'HIV in Uganda ed effettuare studi preliminari sulla variabilità dell'HIV per lo sviluppo di vaccini;
- 3) studiare la risposta immunitaria cellulo-mediata.

A partire dal 1994, anno che ha visto l'avvio del progetto, sono stati sviluppati studi in differenti aree, che includono l'epidemiologia, la virologia, l'immunologia, la microbiologia e la clinica delle infezioni da HIV e di altre malattie sessualmente trasmesse (MST).

Alcune ricerche hanno immediata implicazione e applicazione nelle attività di sanità pubblica, quali la costruzione di un

appropriato algoritmo per l'HIV e l'informazione che l'HIV-2 non è ancora circolante nel nord Uganda.

Gli studi epidemiologici forniscono informazioni sulla prevalenza, l'incidenza e i fattori di rischio per l'HIV tra differenti gruppi (studenti, donne incinte, ricoverati e pazienti ambulatoriali), dati di fondamentale importanza sia a scopo di sorveglianza che per la pianificazione di attività preventive e di assistenza. Uno studio sulla prevalenza delle malattie sessualmente trasmesse colma le lacune esistenti sulla diffusione delle MST nell'area e verrà utilizzato per individuare le infezioni per le quali è necessario un programma di screening.

Infine, alcuni studi hanno obiettivi a lungo termine e contribuiscono alla ricerca portata avanti sia in Uganda che a livello internazionale per lo sviluppo di vaccini e immunoterapie che garantiscano una protezione immunitaria. Questi includono la coorte, di tipo "aperto", di studenti in cui l'arruolamento è continuo, così che è sempre disponibile una popolazione fruibile per: studi di valutazione di interventi e vaccini; studi sulla variabilità del gene *tat* dell'HIV e la risposta anticorpale e cellulare agli antigeni *tat*; comparazione dei parametri immunologici e virologici tra pazienti HIV ugandesi e italiani in relazione alla patogenesi del virus HIV; studio pilota sul possibile ruolo protettivo delle IgA HIV-specifiche; ricerche sulla prevalenza dell'HHV-8 e su neoplasie associate all'AIDS nella popolazione generale.

Studio clinico controllato sulla trasmissione verticale (PETRA Study). - Nel corso del 1995, si è partecipato alla messa a punto di un protocollo per uno "Studio clinico controllato, randomizzato, doppio cieco, con placebo, per la valutazione dell'efficacia e

della tollerabilità di tre protocolli terapeutici con zidovudina in combinazione con lamivudina per la prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV-1". Lo studio, chiamato PETRA (PERinatal TRANsmission), si realizza presso 5 siti in 3 paesi africani sotto il coordinamento dell'UNAIDS (precedentemente GPA-WHO).

Lo studio è stato disegnato prendendo in considerazione uno dei risultati più significativi ottenuti negli ultimi anni nella lotta all'AIDS. Infatti, lo studio clinico controllato di fase III (ACTG 076), condotto negli Stati Uniti e in Francia, ha indicato chiaramente l'efficacia della terapia antiretrovirale nella prevenzione della trasmissione verticale. Tuttavia, i risultati dello studio 076 sono effettivamente applicabili solamente ad una popolazione limitata di donne HIV-infette e non sono certamente applicabili nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, e in particolare in Africa.

Pertanto, per esplorare la possibilità di un'applicabilità globale degli antiretrovirali nella prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV, è stato ritenuto essenziale valutare regimi farmacologici di più semplice somministrazione e di minor costo che possano essere applicabili ad un più ampio spettro di donne HIV-infette, in particolare modo nei paesi in via di sviluppo.

Lo studio si pone i seguenti obiettivi primari:

- 1) valutare l'efficacia e la tolleranza di tre protocolli usando zidovudina (AZT) in combinazione con lamivudina (3TC) verso placebo, per la prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV-1 in una popolazione dove l'allattamento al seno è la norma;
- 2) identificare il protocollo migliore rispetto all'efficacia, la tolleranza e i costi.

Disegno dello studio. - Studio clinico controllato di fase III, randomizzato, in doppio-cieco, multicentrico, si svolge in Uganda (Kampala, due ospedali), Sudafrica (Durban e Johannesburg) e Tanzania (Dar-es-Salaam). Il campione dello studio è rappresentato da 1900 donne in gravidanza, con infezione da HIV-1 che vengono arruolate ad un'età gestazionale di 36 settimane.

Lo studio prevede 4 tipi di trattamento: a) è previsto il trattamento *pre-partum*, *intra-partum* e una settimana *post-partum* (madre e bambino); b) è previsto il trattamento *intra-partum* e una settimana *post-partum* (madre e bambino); c) è previsto solo il trattamento *intra-partum*; d) placebo.

L'efficacia dei regimi terapeutici verrà valutata mediante la determinazione dell'infezione da HIV-1 nei bambini mediante PCR a tempi diversi del follow-up (durata prevista del follow-up: 18 mesi) o mediante sierologia a 18 mesi. Verrà effettuata un'analisi precoce usando i campioni raccolti a 6 settimane e 3 mesi di età, mentre l'analisi finale sarà effettuata valutando le infezioni nei campioni raccolti a 18 mesi di età per valutare l'impatto dell'allattamento materno sulla possibile efficacia dei regimi terapeutici. La durata prevista dello studio è di 3 anni.

Attività svolte. - A causa di sopraggiunti problemi politici e di insicurezza nell'area di Gulu all'inizio del 1996, si è considerato impossibile partecipare al trial con il sito di Gulu e si è svolto uno studio di fattibilità per valutare la disponibilità e l'appropriatezza dell'Ospedale "St. Francis Nsambya" di Kampala, quale sito per il trial. Nel novembre 1996, è stato inviato in Uganda un medico pediatra per svolgere le attività preparatorie, formative e quindi avviare lo studio, con l'attività di screening, finalizzata al potenziale arruolamento di donne eleggibili

per lo studio. All'inizio del mese di maggio 1997, dopo il secondo workshop per il completamento del training, è iniziato l'arruolamento. Dopo il parto le madri vengono seguite secondo un programma di visite previsto dal protocollo. Nel caso di eventi avversi gravi il coordinatore del trial viene informato mediante fax entro 24 ore.

Piano di intervento di sanità pubblica: appoggio al Programma nazionale di lotta all'AIDS in Uganda. - Le due componenti di ricerca e la componente di sanità pubblica sono tra loro strettamente intersecate: in particolare i progetti di ricerca ricevono dal programma di intervento tutto l'appoggio logistico e infrastrutturale necessario. D'altra parte le componenti di ricerca offrono al piano di intervento la consulenza scientifica necessaria.

Le attività del Piano di intervento di sanità pubblica vengono realizzate principalmente presso l'Ospedale "St. Mary's Lacor" (sede del progetto di ricerca) e nel Distretto di Gulu. Alcune attività di sanità pubblica per l'HIV-AIDS vengono portate avanti anche dalle organizzazioni non governative italiane presenti in Uganda (AVSI e CUAMM) in altri distretti del nord Uganda (Kitgum, Hoima, Arua e Nebbi) con fondi dell'Ambasciata d'Italia a Kampala.

Il progetto si pone i seguenti obiettivi:

1) migliorare la prevenzione, la diagnosi, il trattamento e il counselling dell'infezione da HIV e delle patologie connesse quali le malattie sessualmente trasmesse e la tubercolosi, attraverso il rafforzamento delle attività di sanità pubblica;

2) rafforzare e sostenere i laboratori locali riguardo alla loro abilità e accuratezza nell'eseguire diagnosi e attività di ricerca;

3) migliorare le capacità degli operatori sanitari per fronteggiare l'epidemia di AIDS;

4) realizzare un modello articolato di collaborazione ad alti contenuti tecnici, scientifici ed etici nel paese, in piena collaborazione con l'OMS e gli altri paesi donatori;

5) qualificare l'intervento sanitario italiano già in atto, attraverso un ruolo di collaborazione più stretto con le realtà locali sugli interventi sanitari decentrati necessari ad arrestare o, almeno, limitare l'ulteriore diffusione della pandemia.

Il progetto ha condotto le attività in tre direzioni principali: la prima riguarda il rafforzamento dei servizi per la diagnosi dell'HIV/MST e per la gestione clinica dei pazienti HIV. Questo ha assicurato da una parte la disponibilità di test per HIV/MST per un crescente numero di persone e dall'altra una gestione efficiente dei pazienti HIV, anche in termini di assistenza e "counselling", sempre in accordo con le linee guida nazionali.

La seconda direzione ha riguardato la prevenzione: il progetto ha realizzato sessioni educative sull'HIV/MST per i pazienti dell'ospedale e per gli studenti coinvolti nelle attività di ricerca, ha organizzato seminari per gli insegnanti incaricati dell'educazione sanitaria nelle scuole del Distretto di Gulu e, infine, ha assicurato il necessario supporto nelle situazioni di emergenza alla Banca del sangue di Gulu per la prevenzione di questa via di trasmissione.

La terza direzione ha consistito in tutte quelle attività tese a monitorare le infezioni da HIV nel Distretto di Gulu (raccolta dati e analisi, screening, sorveglianza e notifica) e a valutare la situazione sanitaria del di-

stretto anche in rapporto alla situazione del paese. Infatti, mentre la diffusione dell'HIV è ben nota nel sud Uganda, le informazioni sono piuttosto scarse per il nord del paese.

Infine, si è posta particolare attenzione alle attività di formazione per il personale sanitario e per i "counsellor", sia con la realizzazione di corsi e seminari e la formazione in servizio, sia con l'acquisto di libri e riviste mediche.

Istituzioni coinvolte. - Oltre ai Laboratori di Epidemiologia e biostatistica e di Virologia dell'ISS, sono coinvolte nel progetto le seguenti istituzioni: Ospedale "St. Mary's Lacor", Gulu, Uganda; Ospedale "St. Francis Nsambya", Kampala, Uganda; Divisione di Malattie Infettive, Ospedale "Luigi Sacco", Milano, Italia; Cattedra di Immunologia, Università degli Studi, Milano, Italia; Ospedale "S.M. Annunziata", Unità Operativa di Malattie Infettive, Firenze, Italia; Ministero della Sanità, Entebbe, Uganda; Ugandan Virus Research Institute (UVRI), Entebbe, Uganda; Joint Clinical Research Centre (JCRC), Kampala, Uganda; Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), Ginevra, Svizzera; NATEC, University of Amsterdam, Olanda; Direzione Generale per la Cooperazione allo Sviluppo (DGCS), Ministero degli Affari Esteri, Roma, Italia; Associazione Volontari per il Servizio Internazionale (AVSI), Kampala, Uganda; Collegio Universitario Aspiranti e Medici Missionari (CUAMM), Kampala, Uganda; Meeting Point (organizzazione non governativa ugandese), Kampala, Uganda.