

### 3.1 Progetti di ricerca finanziati sul Fondo sanitario nazionale

In base all'art. 12 del DLvo 502/1992, dal 1993 il Fondo sanitario nazionale ha assegnato all'Istituto Superiore di Sanità finanziamenti per lo sviluppo di attività di ricerca e di intervento sul territorio, coerenti con gli obiettivi del Piano sanitario nazionale.

I progetti, coordinati da un Comitato scientifico costituito da personalità di riconosciuta e documentata esperienza nel settore, sono gestiti attraverso bandi nazionali di ricerca ("Call for proposals") o azioni coordinate di ricerca (sulla falsariga dei "progetti strategici" del CNR).

Ad oggi sono stati attivati 19 progetti, i cui risultati vengono di seguito riportati.

#### 3.1.1 Sangue

Ai sensi del DLvo 502/1992 è stato attivato un progetto di ricerca "Sangue" che ha compreso sia lo sviluppo di azioni coordinate di intervento e ricerca (a supporto dei compiti illustrati nella Sezione 2.2.1) che la promozione di un progetto di ricerca finalizzata nel settore della medicina trasfusionale.

##### *Azioni coordinate di intervento*

*Registro del sangue e del plasma.* - Il Registro del sangue e del plasma (istituito nel 1991 e modificato nel 1996) è un sistema informativo stabile per la conoscenza dei dati relativi alla raccolta e alla distribuzione del sangue/plasma umano e al complesso delle attività svolte dai servizi e centri trasfusionali esistenti sul territorio nazionale. Sulla base dei dati inviati dalle singole

regioni, l'Istituto prepara un rapporto annuale per il Ministro della Sanità, che viene successivamente pubblicato e diffuso a tutte le strutture interessate. A tutt'oggi sono stati pubblicati i rapporti relativi agli anni 1991, 1992, 1993, 1994 e 1995. E' in corso di pubblicazione il rapporto relativo all'anno 1996.

I risultati comparativi degli anni considerati mostrano una tendenza ad un aumento nel numero dei donatori, in particolare da aferesi. Le unità di sangue intero raccolte sono rimaste pressoché invariate nel tempo, in accordo con quanto atteso, considerato che l'autosufficienza di emazie poteva, già da tempo, considerarsi virtualmente raggiunta, almeno a livello nazionale. Viceversa, si è verificato un netto aumento nella quantità di plasma prodotto (circa 400 000 litri nel 1992 *vs* circa 560 000 litri nel 1996), sia per maggiore scomposizione del sangue intero (che ha raggiunto il 95%, secondo l'obiettivo del "Piano sangue/plasma nazionale 1994-1996") sia per l'aumento del numero di donatori di plasma. Conseguentemente è aumentata la quantità totale di plasma avviato all'industria per il frazionamento (da 250 000 litri nel 1992 a 407 000 nel 1996), raggiungendo circa il 50% del fabbisogno medio nazionale. A tale proposito c'è da osservare che una quota eccessivamente elevata di plasma è utilizzata per uso clinico (~ 115 000 litri invariati nel tempo): ciò è doppiamente dannoso sia perché sottrae plasma al frazionamento, sia perché la sua utilizzazione in clinica non sempre è giustificata ed è comunque rischiosa per quanto riguarda la sicurezza virale.

La diffusione dei dati relativi al Registro "Sangue" ha consentito alle singole regioni la conoscenza delle situazioni locali e quin-

di ha dato loro la possibilità di pianificare gli adeguati interventi per il raggiungimento dell'autosufficienza regionale, presupposto indispensabile per quella nazionale.

*Epidemiologia e prevenzione delle infezioni trasmesse via sangue ed emoderivati.* - Nell'ambito del SEIEVA (Sistema di sorveglianza per le epatiti acute) è stato implementato il sistema di sorveglianza delle epatiti acute a seguito di trasfusione e sono iniziate ricerche per la valutazione del rischio di infezione post-trasfusionale da HBV e HCV. Negli ultimi anni è stata osservata una diminuzione dell'incidenza dell'epatite B (da 18/milione del 1984 a 0,4/milione nel 1996) e dell'epatite non-A non-B (da 4,4/milione nel 1984 a 0,2/milione nel 1996 con un netto calo nel 1990, anno di introduzione dello screening per HCV). Inoltre, nel 1996 sono stati osservati solo 7 casi di epatite sicuramente associati a trasfusione. Da questi dati si conferma l'efficacia dello screening obbligatorio per HBsAg e per HCV (con kit di 3<sup>a</sup> generazione) anche se non si ha, con questi test, la possibilità di eliminare completamente il rischio di infezione.

E' iniziato uno studio retrospettivo dell'incidenza di infezione da HBV e HCV in donatori periodici con la stima del rischio di infezione a seguito di trasfusione. Lo studio, che ha coinvolto 15 servizi trasfusionali, prende in esame le donazioni effettuate dal gennaio 1994 (anno di introduzione dei kit di 3<sup>a</sup> generazione) al 30 giugno 1997, da donatori che nel periodo abbiano donato almeno due volte (di cui la prima negativa ai test di screening). I dati sono attualmente in fase di raccolta.

E' iniziato uno studio sull'incidenza dell'infezione da HCV a seguito di trasfusione nella popolazione generale in tre città localizzate nelle aree del nord, del centro e del

sud Italia. La ricerca comprende sia uno studio di prevalenza (attraverso la compilazione di un apposito questionario) che l'esecuzione ad intervalli regolari (ogni 3 anni) dei test per HCV sui soggetti negativi ai precedenti controlli con l'intento di indagare sulle eventuali nuove sier conversionsi.

*Sicurezza di qualità dei test di screening obbligatorio su tutte le unità donate.* - E' proseguito il programma di valutazione esterna di qualità dei test di screening dei marcatori di malattie infettive effettuati su ogni singola sacca di sangue donato, in corso dal 1992 (per anti-HIV dal 1989). La partecipazione, volontaria e gratuita, è andata aumentando e attualmente è di circa 350 servizi trasfusionali distribuiti su tutto il territorio nazionale.

In mancanza della possibilità di eseguire ispezioni non previste dalla Legge 107/1990 il programma ha rappresentato l'unico mezzo disponibile per conoscere e monitorare la qualità dei servizi prestati dai singoli servizi trasfusionali e, in particolare, del sangue/plasma trasfusi.

Inoltre, il programma ha consentito di valutare la "performance" dei kit diagnostici "sul campo", mettendo in evidenza per alcuni kit la possibilità di una variabilità tra lotti tale da incidere sulle loro caratteristiche di sensibilità. In tali casi è stata avviata la procedura di controllo di Stato lotto per lotto (HBsAg).

*Valutazione e standardizzazione dei metodi di rilevamento dei marcatori correlati alla trasmissione di malattie infettive.* - Tale attività è stata svolta sia attraverso il controllo della validità delle metodologie applicate, in forma capillare, nelle strutture del Servizio sanitario nazionale anche deputate alla sicurezza del sangue, sia attraverso lo sviluppo di nuove metodologie.

Per quanto attiene al primo punto si è provveduto a:

a) controllo dei diagnostici per il rilevamento di HBsAg e anti-HCV (nel 1995/1997 - 95 controlli);

b) controllo dei singoli lotti messi in atto come procedura non ordinaria per circa 15 kit diagnostici (nel 1995/1997);

c) controllo sulla documentazione dei servizi trasfusionali in relazione ad episodi del ritiro dal commercio di lotti di kit diagnostici;

d) attività di consulenza nei confronti dei laboratori del sistema trasfusionale nazionale; tale attività è stata riferita alla definizione di specifiche problematiche di diagnosi. In alcuni casi sono stati esaminati campioni relativi a "particolari" situazioni diagnostiche richiedenti studi di caratterizzazione virologica (infezioni con varianti virali);

e) attività didattica (corsi ISS, partecipazione a corsi ESMT).

Lo sviluppo di metodologie è stato finalizzato alla diagnostica del virus dell'epatite C nell'ambito delle problematiche inerenti all'impatto che la variabilità virale ha in questo settore: in particolare è stata messa a punto una metodica PCR caratterizzata da alta sensibilità per il rilevamento di HCV-RNA in campioni di dubbia interpretazione di positività al RIBA. Inoltre, è stata messa a punto una metodica rapida per lo sviluppo dei subtipi 2C di HCV (endemic in alcune regioni italiane), non caratterizzabile con le attuali metodiche rapide.

*Controllo di qualità dei prodotti emoderivati.* - Sono proseguiti studi di standardizzazione e validazione di metodi di amplificazione genica per la ricerca di genomi virali in emoderivati e plasma pool. Tali studi, in parte effettuati in collaborazione

con organismi internazionali quali NIBSC, sono stati rivolti a:

a) verifica della sensibilità e riproducibilità dei vari metodi di amplificazione;

b) definizione di uno standard internazionale di riferimento per il virus dell'epatite C; tale studio ha portato all'adozione del primo standard internazionale per HCV-RNA (10 UI/ml);

c) verifica della sensibilità dell'amplificazione genica nei confronti del parvovirus B19 e del virus dell'epatite A.

Sono stati, inoltre, effettuati studi retrospettivi per valutare la presenza di RNA per epatite C e G in preparazioni commerciali di immunoglobuline. Essi hanno dimostrato una netta caduta del contenuto di HCV-RNA dopo il 1993, anno di introduzione dello screening per HCV nei plasma pool destinati al frazionamento (dal 45% di positività tra il 1990-1992 allo 0% dopo il 1993).

Corrispondentemente si è mantenuto costante nel tempo il contenuto di HGV-RNA che è risultato diverso a seconda del tipo di preparazione preso in considerazione (60% nelle i.m., 5% nelle i.v., probabilmente in rapporto ai diversi metodi di purificazione).

#### *Promozione di un progetto di ricerca finalizzato*

Per quanto riguarda l'ampliamento delle conoscenze nel settore della medicina trasfusionale si è ritenuto opportuno ricorrere al bando di un progetto nazionale a cui hanno partecipato tutti i ricercatori interessati, afferenti a strutture sia di sanità pubblica che accademiche o clinico-ospedaliere.

Il progetto è stato articolato in tre sottoprogetti:

1) Autosufficienza di sangue e prodotti (miglioramento e standardizzazione della

pratica trasfusionale, gestione della qualità globale della certificazione, registri nazionali, incremento della disponibilità sanguine e plasma);

2) Sicurezza del sangue e prodotti (studi epidemiologici, sviluppo metodologico, controlli di qualità);

3) Sviluppo tecnologico (raccolta e conservazione di sangue ed emocomponenti, cellule staminali emopoietiche, prodotti ricombinanti, trasportatori di ossigeno).

Sono stati finanziati 61 progetti presentati da ricercatori di istituzioni pubbliche italiane. Lo stato di avanzamento dei progetti finanziati e i risultati ottenuti sono stati vagliati nell'apposito convegno svoltosi il 9 e 10 dicembre 1997.

Si riportano di seguito i principali risultati relativi ai tre sottoprogetti afferenti al primo progetto "Sangue", con particolare riferimento alla loro trasferibilità sul territorio.

*Autosufficienza del sangue e dei suoi prodotti.* - Sono stati presentati i risultati di alcuni progetti pilota riguardanti l'adozione di programmi computerizzati per la valutazione dell'efficacia trasfusionale e per il miglioramento e la standardizzazione della pratica trasfusionale.

E' stato inoltre fornito un modello per la raccolta dei dati e l'elaborazione di indicatori per monitorare e migliorare la pratica trasfusionale.

Sarebbe auspicabile che i risultati di tali progetti potessero essere completati mediante l'ampliamento della sperimentazione a più centri e quindi trasferiti alle regioni per l'implementazione del buon uso del sangue e per la riduzione del fabbisogno trasfusionale.

Nel settore delle donazioni, è stato presentato un progetto pilota per la selezione

di donatori volontari di plasma iperimmune. La produzione di plasma iperimmune nazionale rappresenta a tutt'oggi un problema e pertanto è particolarmente interessante uno studio di tal genere i cui risultati preliminari indicano che la strategia migliore per ottenere donatori ad alto titolo anticorpale è quella di vaccinare con una dose "booster" soggetti immunizzati naturalmente. E' comunque emersa evidente la necessità di apportare modifiche ai criteri medico-legali ed etici in uso in Italia per la vaccinazione di soggetti volontari.

In merito alla gestione qualità globale-certificazione, sono stati presentati i risultati relativi a più progetti riguardanti l'implementazione di un sistema di qualità nei servizi trasfusionali. In particolare è da sottolineare lo sforzo compiuto dalla Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunematologia (SIMTI), il cui progetto è stato suddiviso in due fasi: la prima basata su corsi per i responsabili dei servizi trasfusionali e dell'assicurazione di qualità circa il significato dell'adozione di un sistema di qualità e la sua metodologia, la seconda basata su visite specifiche ai servizi per un Audit.

Altri progetti hanno fornito i dati preliminari relativi a modelli per la definizione dei requisiti minimi di qualità per l'accreditamento delle strutture trasfusionali e a modelli gestionali e organizzativi, di normazione, di valutazione e certificazione.

Data l'importanza della diffusione del sistema di qualità sull'intero territorio nazionale, sarebbe opportuno il proseguimento dell'attività del progetto SIMTI per consentire la realizzazione della fase 2 (Audit). Parimenti dovrebbero essere sostenuti i progetti riguardanti i requisiti minimi di qualità e i modelli gestionali per i quali è stato possibile effettuare solo una prima fase organizzativa e ricognitiva.

E' inoltre da sottolineare un progetto pilota svolto presso un servizio trasfusionale che ha implementato un sistema di qualità legandolo alle particolari condizioni territoriali.

Sono state, inoltre, date indicazioni circa l'organizzazione di un servizio trasfusionale nell'emergenza attraverso il monitoraggio del tempo di risposta e la valutazione della sicurezza del sangue trasfuso studiando le condizioni immunologiche e sierologiche del paziente al momento dell'ospedalizzazione, alla dimissione e dopo 6 mesi. Sarebbe auspicabile l'ampliamento della sperimentazione ad altri centri per verificare la possibilità di preparare linee guida per l'emergenza.

*Sicurezza del sangue e dei suoi prodotti.* - Le ricerche svolte nel settore della sicurezza virale hanno dimostrato quanto segue.

a) Virus epatitici. La probabilità di trovare un donatore con ALT nel range normale, HBsAg negativo, anti-HBC positivo e HBV DNA positivo è praticamente inesistente in Italia (studio multicentrico). Questo dato conferma la non opportunità di aggiungere questo tipo di test ai test di screening obbligatori.

Un altro studio è stato rivolto alla valutazione del significato dei campioni "indeterminati" e dell'eventuale coinvolgimento di particolari varianti di HCV attraverso la caratterizzazione molecolare di sieri trovati positivi all'ELISA ma indeterminati al RIBA. Questo studio, di cui sono stati forniti risultati preliminari in 26 donatori, dovrebbe essere esteso ad altre regioni italiane.

Per quanto riguarda l'epatite G è stato dimostrato che essa è endemica e persistente nei donatori di sangue italiani e che la coinfezione HCV non causa una malattia epatica più severa.

b) HTLV1/2 e HH8. Dati preliminari sulla prevalenza di HTLV1/2 tra i donatori italiani (studio multicentrico) mostrano che essa è quasi zero. Anche in questo caso, quindi, dati sperimentali hanno chiarito che nella popolazione italiana non è necessario introdurre gli screening per tali marcatori.

Interessanti sono i dati riguardanti la prevalenza di HH8 nei donatori di sangue e le vie di trasmissione. Nel 28% dei donatori esaminati sono stati messi in evidenza gli anticorpi litici anti-HH8 e i risultati della trasmissione suggeriscono che il virus possa essere trasmesso anche con il sangue. La trasfusione con prodotti contaminati HHV8 può essere dannosa per i pazienti con segni di attivazione immunologica e aumentati i livelli di 1C come, per esempio, potenziali riceventi di trapianti d'organo.

Sarebbe pertanto opportuno il proseguimento di questi studi per lo sviluppo di un metodo standardizzato che consenta la sorveglianza della trasfusione di prodotti ematici in tali tipi di pazienti attraverso il controllo sia dei donatori che dei riceventi.

c) Parvovirus B19. Uno studio su 208 donatori dell'area lombarda ha messo in evidenza che c'è un'alta prevalenza (76%) di donatori positivi con un'incidenza di viremia bassa ma sufficiente per far sì che molti plasma pool utilizzati per la produzione di emoderivati contengano il virus.

d) CMV. E' stato messo a punto un metodo PCR rapido che consente di quantificare CMV-DNA genomico in una singola reazione effettuato in meno di 20 minuti.

In merito al controllo di qualità dei test sierologici, sono stati forniti i risultati preliminari di uno studio volto a preparare e calibrare sieri di riferimento per il controllo di qualità interno dei test sierologici. Lo studio dovrebbe essere completato con una

seconda fase (prevista nel progetto) volta a verificare la prestazioni dei campioni preparati in un trial che coinvolga un certo numero di laboratori e alla messa a punto di un software per la gestione dei dati.

Un ulteriore risultato dello studio, se proseguito, potrebbe essere la risoluzione del problema della "zona grigia" attraverso la verifica delle procedure di controllo di qualità interno e l'utilizzazione di campioni calibrati di riferimento.

Campioni e software dovrebbero essere messi a disposizione dei servizi trasfusionali.

Riguardo all'incidenza di errori di disattenzione nella pratica trasfusionale, è stato adottato un metodo per il controllo di qualità della pratica trasfusionale a letto del malato, dato che gli errori di disattenzione fatali sono 1/1000-3000 unità trasfuse.

Sono stati forniti dati preliminari che hanno messo in evidenza come, su 4238 unità trasfuse, siano stati evitati 22 errori metodologici (1/193 unità trasfuse) ed è stato evitato un potenziale caso fatale (tentativo di trasfusione di un paziente non candidato alla trasfusione con sangue destinato ad altro paziente).

Lo studio dovrebbe essere ampliato ad altri centri e i risultati dovrebbero essere pubblicizzati al massimo per le opportune misure da adottarsi a livello locale.

*Sviluppo tecnologico.* - E' stato sviluppato un software per la conservazione e la informatizzazione di dati relativo al controllo di qualità degli emoderivati. Sarebbe auspicabile che il software fosse reso disponibile sul territorio.

E' stato effettuato un confronto dei costi di preparazione del contenuto piastrinico con 3 diverse metodiche. Questo studio dovrebbe essere ampliato ad altri centri di regioni diverse per verificarne la validità in

altre realtà operative e quindi i risultati dovrebbero essere resi disponibili per le regioni e l'Autorità nazionale, anche in rapporto alla fissazione dei prezzi di cessione di preparazioni di emocomponenti.

Interessanti per i possibili trasferimenti futuri sul territorio sono gli studi relativi all'inattivazione virale di emocomponenti (FFP e concentrati piastrinici). E' stato messo a punto un metodo basato su tecniche fotodinamiche che mostrano nei campioni trattati una riduzione di 4-5 log per HIV, l'assenza della banda nella regione genomica PI di Parvovirus B19 e una diminuzione del genoma HCV fino al 50%. Sarebbe opportuna la continuazione di tali studi per dimostrare la non tossicità di tale trattamento e quindi la loro validazione per l'applicazione sul territorio nazionale.

E' stata, inoltre, sottolineata l'importanza di stabilire linee guida per la standardizzazione dei metodi e delle procedure e per la sicurezza di qualità nella conduzione di una banca di cellule staminali. Sarebbe opportuno che l'Istituto Superiore di Sanità si facesse carico di coordinare una ricerca in tal senso, magari con uno studio collaborativo con il GRACE.

Riguardo agli studi sulle cellule staminali in oncematologia e la riduzione del fabbisogno trasfusionale, si è trattato generalmente di ricerche di alto livello che si collocano nell'area della ricerca di base, la maggior parte delle quali con studi ancora in corso che dovrebbero essere continuati e sviluppati. Si sottolineano in particolare:

- a) gli studi sulla purificazione delle cellule staminali che potrebbero portare in breve alla sua caratterizzazione ed espansione *in vitro*, verosimilmente anche in campo di utilizzazione in metodologia trasfusionale;
- b) la realizzazione di un protocollo riguardante il trapianto di midollo nel trat-

tamento di bambini affetti da immunodeficienza primaria usando l'associazione di "stem cells" periferiche dopo mobilizzazione con G-CSF a cellule di midollo.

In merito ai sostituti del sangue, particolarmente interessanti per i possibili sviluppi futuri sono gli studi sulle Hb ricombinanti

come possibili trasportatori artificiali di ossigeno. Hb naturale è stata trasformata introducendo mutazioni amminoacidiche nella tasca dell'emme. Le Hb mutanti sono state purificate e dovrebbero iniziare studi sulla caratterizzazione delle proprietà funzionali di tali Hb varianti.

### 3.1.2 Sostituzioni funzionali, organi artificiali e trapianti di organo

Il progetto "Sostituzioni funzionali, organi artificiali e trapianti di organo", finanziato con i fondi messi a disposizione dal DLvo 502/92, art. 12, affronta alcune problematiche relative al ripristino di funzioni di organi e tessuti attraverso la loro sostituzione completa oppure attraverso ausili artificiali che affiancano l'organo naturale coadiuvandolo o sostituendolo nello svolgimento delle proprie funzioni.

Il progetto utilizza sia unità operative interne all'Istituto che unità operative esterne reperite tramite un bando nazionale, pubblicato sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* del mese di ottobre 1995 (Vol. 8, n. 10, Suppl. 1) e al quale è stata data ampia diffusione tra la comunità scientifica italiana.

Le unità operative esterne sono state selezionate facendo ricorso a referee esterni e ad una valutazione del Comitato scientifico del progetto, istituito con decreto del Ministro della Sanità del 6 marzo 1995. Il criterio di selezione principale è stato di attivare ricerche a sostegno degli obiettivi del Piano sanitario nazionale che potessero avere ricadute a breve termine sulle prestazioni del Servizio sanitario nazionale e che fossero complementari con le attività svolte in Istituto.

Complessivamente sono pervenute 141 proposte di ricerca, le più numerose nel settore dei dispositivi per il recupero dell'apparato locomotore e in quello dei trapianti di organo. Alla fine del processo di selezione sono risultate operanti 8 unità interne e 60 unità esterne, con un finanziamento medio di 53 milioni/anno, suddivise nelle 4 aree di intervento del progetto (Ingegneria dei tessuti, Endoprotesi cardio-

vascolari, Protesi e dispositivi esterni per il miglioramento e il recupero della funzionalità dell'apparato locomotore, Trapianti di organo).

Tra il 17 maggio e l'11 giugno 1996 si sono tenuti workshop per ciascuna area di ricerca, dove sono stati illustrati tutti i programmi di ricerca e sono state definite, con il coordinamento dell'Istituto, le possibilità di collaborazione tra le varie unità operative. I sommari delle proposte sono stati pubblicati in un rapporto dell'Istituto.

Tra il 20 e il 21 febbraio 1997 si sono tenuti workshop sullo stato di avanzamento delle ricerche. I risultati preliminari (6 mesi) hanno mostrato l'entusiasmo con il quale tutte le unità hanno affrontato le rispettive ricerche e collaborato con altre unità quando questo è stato possibile. Sono stati presentati rapporti sintetici sullo stato di avanzamento delle ricerche, riportando le difficoltà incontrate e le eventuali pubblicazioni. Lo stato di avanzamento è stato oggetto di un rapporto dell'Istituto.

Tra la fine di settembre e l'inizio di ottobre 1997 sono stati tenuti workshop sui risultati conseguiti dalle varie ricerche al termine del primo anno di attività. Una raccolta di rapporti preparati per ogni ricerca è stata pubblicata in un rapporto dell'Istituto.

*Ingegneria dei tessuti.* - Sono state finanziate 9 linee di ricerca svolte all'esterno dell'Istituto e una svolta all'interno nel Laboratorio di Ingegneria biomedica.

Quattro delle linee esterne riguardavano l'ingegneria dell'epidermide ricostruita *in vitro*, del derma e dei tessuti molli in generale. Soprattutto gli studi sull'epidermide si sono rilevati tra i più significativi in considerazione della ricaduta sul sistema sanitario nazionale.

Altre quattro linee si occupavano della coltura degli endoteli su protesi vascolari e, in particolare, due di quest'ultimi hanno concentrato i loro studi sulla caratterizzazione e sulla preparazione del biomateriale con il quale deve essere realizzato il dispositivo protesico che, nello stesso tempo, costituisce il substrato artificiale sul quale viene coltivato l'endotelio.

Una linea di ricerca si è interessata, infine, della coltura *in vitro* di tessuto cartilagineo ed osso e ha portato alla ricostruzione di ampi segmenti ossei e al loro impianto sperimentale su pecora.

All'interno dell'Istituto è stata attivata una linea di ricerca indirizzata alla caratterizzazione e alla valutazione delle prestazioni meccaniche dei tessuti biologici ricostruiti *in vitro* e, inoltre, ha contribuito alla stesura di protocolli e normative per la produzione e la sicurezza in questo settore.

*Endoprotesi cardiovascolari.* - Sono state finanziate 15 linee di ricerca svolte all'esterno dell'Istituto e 3 svolte nel Laboratorio di Ingegneria biomedica dell'Istituto.

Partendo dalla constatazione che la domanda di protesi e di sostituzioni funzionali è costantemente in continuo aumento nel mondo di pari passo con il consolidarsi delle più recenti innovazioni tecnologiche, dell'estendersi delle applicazioni cliniche, della sempre più pressante richiesta di qualità della vita anche in età avanzata, tutte le linee di ricerca finanziate perseguono almeno uno dei due obiettivi principali: quello della caratterizzazione di protesi artificiali passive, anche al fine dell'ottimizzazione di tali dispositivi e al miglioramento del loro utilizzo, e quello di valutazione e sviluppo di nuovi dispositivi e tecniche ad essi connessi.

In particolare, le ricerche finanziate coprono i seguenti settori: la valutazione e

caratterizzazione di protesi quali le valvole cardiache (3 ricerche), i vasi protesici e "stent" (3 ricerche), i VAD (4 ricerche), e lo sviluppo di algoritmi (2 ricerche) e sistemi (3 ricerche) per la defibrillazione atriale, consentendo di affrontare, in maniera spesso innovativa e sempre più efficacemente, patologie di rilevanza sociale su grandi strati di popolazione con ricadute significative sull'SSN.

Per quanto riguarda il Laboratorio di Ingegneria biomedica, la prima ricerca finanziata si è posta l'obiettivo di sviluppare un sistema automatico di interruzione elettrica della fibrillazione atriale. Nel corso del primo anno di attività è stato rispettato in linea di massima l'iter temporale previsto nel progetto; è stato fatto uno studio di fattibilità del sistema, acquisendo tutte quelle competenze necessarie alla definizione di protocolli e alla risoluzione di problematiche di impianto, quali la valutazione delle soglie di energia e del dolore, del tipo e posizionamento degli elettrodi del sistema di riconoscimento e di sblocco. In particolare, è stato messo a punto un algoritmo di riconoscimento della fibrillazione atriale, operante nel dominio del tempo, in grado di classificare in tempo reale il tipo di fibrillazione con elevata sensibilità e specificità. L'algoritmo è stato provato con l'ausilio di una banca dati dinamica, ottenuta da registrazioni endocavitarie su 21 pazienti, effettuate con un sistema di acquisizione appositamente realizzato a tale scopo. Sono state prese in considerazione sia fibrillazioni atriali indotte che croniche. Sono state inoltre definite le specifiche tecniche di sistema delle sottounità di acquisizione e di "sensing" del prototipo di defibrillatore atriale.

Per quanto riguarda la seconda ricerca, l'obiettivo primario era quello di investiga-

re le proprietà fluidodinamiche delle protesi meccaniche a doppia flangia, oggi di grande diffusione sul mercato, e a tal proposito è stata impostata un'analisi anemometrica laser di alta qualità, sia nella disposizione sperimentale che nei presupposti teorici non sempre correttamente utilizzati in letteratura. Lo studio ha previsto una fase iniziale di messa a punto teorico-sperimentale che ha avuto una ricaduta metodologica innovativa. Quindi sono state eseguite sessioni di misura con un sistema bidimensionale per il confronto del campo di turbolenza sviluppato a valle di quattro protesi commerciali di minimo diametro (massimo disturbo al flusso) durante la fase cardiaca di massima apertura degli emidischi; queste misure hanno permesso di stimare lo sforzo di taglio sulla parte corpuscolata del sangue responsabile dell'emolisi riportata nei follow-up clinici; si è ottenuta una prima correlazione positiva sia con i dati di emolisi che con quelli relativi a microembolo cerebrale. I dati ottenuti, comunque, devono essere letti come stime per difetto del reale valore di picco ottenibile per via delle semplificazioni teoriche necessarie legate all'uso di un anemometro bidimensionale. Nel frattempo è stata messa a punto una disposizione sperimentale tridimensionale che consentirà una verifica fluidodinamica completa per le stesse valvole.

La terza ricerca si è occupata della caratterizzazione delle proprietà visco-elastiche delle protesi vascolari sintetiche di piccolo calibro (6 e 8 mm) associate ad una progressiva mancanza di pervietà a lungo termine correlata positivamente con una progressiva perdita di "compliance". Lo studio sperimentale è stato condotto utilizzando protesi di tipo tessile realizzate in maglia di dacron con lo scopo principale di caratte-

rizzare le proprietà strutturali delle protesi vascolari in modo comparativo, utilizzando un protocollo standardizzato (normative internazionali) e tenendo conto dell'effettiva metodica di impianto. È stata inserita così nei protocolli sperimentali la "lunghezza utilizzabile" dal chirurgo all'atto della sostituzione protesica e sono state eseguite misure di compliance per due serie commerciali di protesi a maglia (due diametri). Sono stati monitorati anche i cambiamenti strutturali in un arco di tempo rappresentativo di circa 15 mesi dall'impianto, durante il quale la protesi lavora come se fosse stata inserita nell'albero arterioso ma con battito accelerato. I dati rappresentano un esempio delle differenze funzionali sostanziali tra due tipi di maglia sotto diversi punti di vista come la variazione di compliance con la lunghezza all'impianto, la stessa nel tempo dall'impianto, ed infine la perdita di energia trasmessa per riflessione dovuta ad uno scorretto impianto per via della non osservanza da parte del chirurgo della lunghezza utilizzabile, che è correlata con una perdita di perfusione a valle dell'impianto protesico.

*Protesi e dispositivi per il miglioramento e il recupero della funzionalità dell'apparato locomotore.* - Sono state finanziate 19 ricerche svolte all'esterno dell'Istituto e due svolte all'interno nel Laboratorio di Ingegneria biomedica; 14 della ricerche esterne ricadevano nell'ambito della valutazione delle capacità motorie e 5 nell'ambito dello studio e del perfezionamento di nuovi dispositivi di interesse per il recupero dell'autonomia del disabile e per il suo reinserimento sociale. La gran parte di queste ricerche hanno riguardato le patologie dell'anziano e una soltanto quelle dell'età evolutiva.

Alcune delle prime 14 ricerche hanno avuto come obiettivo primario la promozione, in tempi brevi, dell'impiego clinico di metodologie e di strumenti dell'analisi del movimento già noti, attraverso specializzazioni degli stessi che fossero efficaci per affrontare problemi specifici di rilevanza clinica.

Per la maggior parte delle ricerche del primo gruppo ci si è posto invece, come obiettivo più a lungo termine, l'impiego clinico degli stessi metodi e si è quindi affrontato lo studio e la realizzazione di apparati strumentali che, pur utilizzando conoscenze di base già acquisite, presentavano una parte innovativa.

Tra queste è degna di rilievo la realizzazione di un sistema, che impiegherà un dispositivo indossabile per il telemonitoraggio domiciliare multifunzionale per l'anziano.

Le ultime 5 ricerche hanno affrontato il problema del miglioramento dei sistemi ortesici attraverso lo studio di nuovi materiali e l'ausilio di mezzi sensori o di stimolazione neuromuscolare.

La prima ricerca del Laboratorio di Ingegneria biomedica si è posta l'obiettivo dell'ottimizzazione del processo riabilitativo motorio, favorendo il recupero della funzionalità dell'apparato locomotorio mediante dispositivi di allevio del peso. Nel corso del primo anno di attività è stato rispettato in linea di massima l'iter temporale previsto nel progetto. Si è eseguito uno studio di fattibilità per quanto riguarda la tecnologia da impiegare e i requisiti da soddisfare per la realizzazione di un sistema e sono stati evidenziati i benefici e le ricadute positive sull'SSN derivanti dall'utilizzo di detti dispositivi. Una volta individuata la tecnologia che meglio avrebbe soddisfatto le ipotesi di lavoro è stato realizzato un prototipo del sistema controllato automaticamente, ne è stata fatta la sua caratterizzazione ed è stato utilizzato nel trattamento terapeutico

di 20 pazienti con patologie di tipo ortopedico o neurologico sia di origine traumatica sia degenerativa.

La seconda ricerca del laboratorio è strettamente collegata alla precedente e ne costituisce il completamento relativamente agli aspetti di misura e di valutazione delle capacità motorie. Le risorse disponibili sono state indirizzate allo sviluppo di uno strumento per la telemetria delle forze verticali scambiate tra piede e suolo. In particolare è stata realizzata una soletta sensibile, da introdurre nella scarpa, che funziona in modo tale da rilevare direttamente solo le grandezze di maggior interesse e cioè il valore della forza risultante nei suoi termini di posizione del punto di applicazione e modulo. Questa realizzazione ha dato luogo a domanda di brevetto per invenzione industriale.

*Trapianti di organo.* - Sono state finanziate 17 ricerche esterne all'Istituto e due all'interno. Tutte le ricerche esterne e una di Istituto hanno svolto attività di tipo immunologico, mentre all'interno dell'Istituto è stata avviata una linea di ricerca di tipo gestionale, volta alla realizzazione della rete informatica nazionale per i trapianti d'organo.

Anche alla luce dei risultati riportati nel primo anno di attività si può confermare che i motivi che hanno portato al lancio del primo progetto permangono validi e pertanto l'Istituto Superiore di Sanità ha lanciato un secondo bando sugli stessi temi tranne poche eccezioni, sia per permettere di continuare quelle attività che si sono dimostrate promettenti per le ricadute a breve e medio termine sul Servizio sanitario nazionale, sia per poter meglio sviluppare alcuni temi che, seppur di grande interesse, non hanno ricevuto in occasione del precedente bando l'atteso contributo di proposte di ricerca.

### 3.1.3 Prevenzione dei fattori di rischio della salute materno-infantile

Il progetto affronta numerosi aspetti di ricerca in campo sanitario, finalizzati alla predizione e prevenzione dei fattori di rischio della salute della madre e del bambino. Il settore materno-infantile costituisce, infatti, un'area di intervento strategico e il miglioramento della qualità della vita della madre e del bambino rappresenta uno degli obiettivi sanitari prioritari a livello mondiale. Alla luce di quanto esposto nel progetto, sono stati individuati importanti obiettivi di ricerca riguardanti:

- lo studio e la prevenzione dei possibili fattori di rischio dell'infertilità umana;
- lo studio dell'evento gravidanza in relazione ai fattori di rischio per la salute della donna, del feto e del neonato;
- lo sviluppo della consulenza genetica e della diagnosi prenatale al fine di raggiungere un'adeguata prevenzione primaria e secondaria;
- lo studio e la sorveglianza dei difetti congeniti che rappresentano la principale causa di mortalità perinatale-infantile e sono causa della metà dei ritardi mentali;
- l'approfondimento delle conoscenze, sia in termini di incidenza che di ricerca e prevenzione, delle principali malattie genético-metaboliche;
- lo studio dei fattori di rischio delle principali malattie infantili e la valutazione degli interventi preventivi;
- lo studio delle cause delle ampie differenze di mortalità perinatale che permangono nel nostro paese tra le diverse aree geografiche.

Pertanto il progetto si articola in quattro sottoprogetti: 1) Fertilità; 2) Gravidanza; 3) Neonato; 4) Infanzia. A loro volta, i sottoprogetti si articolano in linee di ricerca.

Il progetto è finanziato con un fondo di 9 miliardi, messi a disposizione dal DLvo 502/1992, art. 12 e si basa sull'attività di ricerca di unità operative interne all'Istituto in collaborazione con istituzioni universitarie, istituti del CNR, centri ospedalieri e strutture del Servizio sanitario nazionale. Esso ha una gestione di tipo "azione concertata di ricerca", che prevede il coordinamento delle attività delle unità partecipanti, con la possibilità di trasferimento di risorse ad unità collaboranti all'esterno dell'Istituto.

Il Comitato scientifico del progetto, presieduto dal Direttore dell'Istituto e composto da quattro membri interni all'ISS e da cinque esterni, nominati contestualmente all'approvazione del programma con decreto del Ministro della Sanità del 6 marzo 1995, ha approvato nella riunione del giorno 14 settembre 1995, dopo valutazione, le linee guida per la gestione del progetto stesso.

I responsabili delle linee di ricerca hanno presentato pubblicamente al Comitato scientifico di progetto, in una riunione appositamente prevista il 15 e 16 gennaio 1996, le linee di ricerca per la finale approvazione dei contenuti delle linee stesse.

Il Comitato scientifico ha, in particolare, definito le procedure per il trasferimento di risorse ad unità operative esterne, valutando l'idoneità a svolgere i compiti assegnati e accertandosi che il contributo scientifico si ponga in perfetta complementarietà con le attività svolte in Istituto.

Alla realizzazione del progetto partecipano 38 unità interne all'Istituto, operative nei vari laboratori.

Per lo sviluppo del progetto sono stati effettuati trasferimenti di risorse a 88

unità operative esterne all'Istituto per un importo pari a circa 4 miliardi.

*Attività scientifica.* - Nello sviluppo del progetto sono stati affrontati gli aspetti di ricerca sanitaria in chiave di predizione e di prevenzione dei fattori di rischio della salute materno-infantile. Sono stati, inoltre, analizzati gli aspetti strategici ed organizzativi dei servizi in relazione ai nuovi orientamenti del sistema sanitario riformato.

Sono stati condotti studi per l'identificazione e la valutazione dei fattori di rischio ambientali e occupazionali nell'infertilità maschile e nello sviluppo prenatale.

Nell'ambito delle problematiche relative alla gravidanza, sono stati presentati i primi risultati di un'indagine epidemiologica sulle conoscenze, gli atteggiamenti e i comportamenti in gravidanza, parto e puerperio di 9000 donne intervistate in 13 regioni italiane.

Sempre nell'ambito della gravidanza sono state oggetto di studio le problematiche relative alla prevenzione di gravi patologie quali diabete e toxoplasmosi. Sono stati, inoltre, condotti studi sugli effetti biologici di sostanze attive nel mantenimento dell'impianto embrionale.

Nell'ambito delle patologie genetico-metaboliche è stata focalizzata l'attenzione allo studio dei difetti genetici dello sviluppo osseo, allo studio della patologia celiaca e della risposta immunitaria mucosale in soggetti con malassorbimento, allo studio della malattia di Gaucher, della ipercolesterolemia familiare, dell'adrenoleucodistrofia, della sindrome di Williams e della malattia emolitica da deficit di G6PD.

E' stato, inoltre, sviluppato lo studio di regioni vulnerabili del genoma umano, delle possibili correlazioni con l'insorgenza di malattie ereditarie e delle eventuali implicazioni nella diagnosi precoce di queste.

E' stato sviluppato, in collaborazione con i vari centri regionali, un programma per lo studio e la sorveglianza delle malformazioni congenite in Italia.

E' stato affrontato lo studio dell'etiopatogenesi del diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) in Sardegna, una regione ad alto rischio che rappresenta un modello di studio per la predizione e la prevenzione di tale patologia, il cui impatto sociale merita una particolare attenzione nell'ambito della sanità pubblica.

Per ciò che riguarda la patologia tiroidea, la cui insorgenza è favorita anche dalla carenza iodica ambientale, sono stati condotti studi collaborativi sul territorio per la caratterizzazione di aree a rischio e per l'applicazione della iodoprofilassi, al fine di contribuire alla prevenzione dei disordini tiroidei, particolarmente diffusi e che colpiscono prevalentemente la donna.

E' stato affrontato il problema della eradicazione della poliomielite in Italia, con esperienze pilota di sorveglianza attiva delle paralisi flaccide acute.

Sono stati condotti studi sui fattori di rischio delle principali malattie infantili: allergie, invalidità infantile sia congenita che acquisita.

E' stato, infine, sviluppato un programma per il coordinamento epidemiologico nazionale dei centri per i tumori infantili.

I risultati raggiunti durante lo sviluppo del progetto sono stati oggetto di presentazione a congressi nazionali e internazionali, di pubblicazioni scientifiche, di workshop realizzati presso l'Istituto in cui è stato fatto il punto sullo stato di avanzamento delle ricerche.

In particolare, sono stati tenuti in Istituto:

- un Convegno internazionale sul diabete e gravidanza;

- Convegni nazionali su: epidemiologia dell'aborto spontaneo; malformazioni congenite; malattie genetiche; sopravvivenza per tumori infantili in Italia; carenza iodica: aspetti di fisiopatologia e prevenzione; celiachia: fisiopatologia, prevenzione e trattamento; infertilità maschile; sorveglianza della toxoplasmosi congenita in Italia; valutazione dell'impatto di tossici ambientali sulla riproduzione maschile; infezioni ospedaliere in terapia intensiva neonatale; asma e allergie infantili.

E' stato organizzato il 15-19 dicembre 1997 un convegno dedicato a "Maternità

ed infanzia. Dall'inizio della vita per la qualità della vita". Il convegno ha rappresentato anche il "progress report" pubblico del progetto, ha definito lo stato dell'arte sulle tematiche affrontate nel progetto stesso e ha messo in evidenza quegli aspetti di studio ed intervento che meritano ulteriore approfondimento.

Complessivamente, nell'ambito del progetto sono stati tenuti 12 convegni, 12 workshop e 32 seminari.

Sono stati ottenuti 2 brevetti, uno a livello nazionale e uno a livello internazionale.

### 3.1.4 Tubercolosi

Fino a pochi anni or sono, la malattia tubercolare (TBC) era stata ignorata e il suo impatto sanitario largamente sottostimato in Italia come negli Stati Uniti e in quasi tutti i paesi dell'Europa occidentale. La sua recente risorgenza, per le cause ormai ben note (infezione da HIV, immigrazione, multiresistenza ai farmaci antitubercolari, trascuratezza del problema TBC, numerose sacche di povertà e di emarginazione sociale), ha portato l'Istituto a formulare un progetto di ricerca nazionale "Tubercolosi" (PNT) che, in un arco di tempo almeno triennale, garantisca un'appropriata allocazione di fondi per rinvigorire la ricerca sull'epidemiologia, la diagnosi, la patogenesi, l'immunità, la prevenzione e la clinica della malattia tubercolare. Nonostante l'esistenza di validi metodi di diagnosi e cura della malattia, in particolare attraverso la strategia sostenuta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e nota come "Short-course, directly observed therapy (DOTS)", bisogna riconoscere che solo nuove armi diagnostiche, terapeutiche e vaccinali potranno accelerare l'eliminazione della malattia tubercolare o perlomeno consentirne il controllo. In particolare, l'emergenza dei ceppi multiresistenti ai farmaci antitubercolari di prima linea, la scarsa efficacia dell'attuale vaccino antitubercolare, nonché la lentezza e/o la bassa sensibilità dei correnti metodi di diagnosi microbiologica, costituiscono serie ragioni di insuccesso nel controllo della malattia nei paesi industrializzati. Il superamento di questi limiti richiede un grosso sforzo scientifico per trovare nuove e più efficaci armi di controllo. Su queste basi, lo scopo di fondo del PNT è di creare una rete di ricercatori qualificati (o meglio, riqualificati) nel settore specifi-

co, le cui ricerche portino a formulare nuovi, e scientificamente più adeguati, strumenti e strategie di lotta alla TBC nel nostro paese. Rinvigorire la presenza dell'Istituto e dei gruppi di ricerca nazionali in un competitivo ambito di ricerca internazionale, nonché favorire la collaborazione fra l'Istituto e le associazioni scientifiche attive nel settore, l'università e l'OMS erano altri obiettivi del progetto. Infine, e in conseguenza, ci si prefiggeva di creare una rete formativa affinché la classe medica potesse aggiornare i contenuti e i relativi strumenti di controllo della TBC in Italia. I risultati che ci si aspetta di ottenere dal progetto sono i seguenti: 1) maggiore conoscenza scientifica generale sul batterio della tubercolosi e sulla tubercolosi; 2) informazioni precise sull'infezione e sulla malattia in Italia, in particolare nei gruppi a rischio vecchi e nuovi (emigranti); 3) valutazione dell'incidenza, nel nostro paese, del fenomeno della multiresistenza ai farmaci antitubercolari; 4) sviluppo e applicazione di tecniche diagnostiche rapide, sensibili e specifiche; 5) sviluppo di nuovi trattamenti chemo- e immuno-terapici; 6) meccanismi di immunità tubercolare con la prospettiva di produrre un nuovo e più efficace vaccino.

Questo resoconto illustra brevemente le azioni svolte e i risultati ottenuti nel primo effettivo biennio di vita del PNT.

*Attività di programmazione, gestione e trasferimento di fondi alle unità operative extra-murali e principali risultati ottenuti*

*Impostazione e lavoro generale.* - Sono stati gestiti due "call for proposals" nazionali per ricerche in tutti i settori della tubercolosi. Al primo bando hanno presentato domande di ricerca 136 e al secondo 132 gruppi nazionali di ricercatori (per lo più in

collaborazione con gruppi esteri) per una richiesta complessiva di circa 20 miliardi di lire contro una disponibilità finanziaria di 9 miliardi complessivi. Le proposte sono state gestite con un software specifico capace di immagazzinare tutti gli elementi fondamentali in esse contenuti (obiettivo, ricercatori, finanziamento, parole chiave, collaboratori, ecc.) per il *matching* successivo con referee italiani e stranieri. Nel secondo "call" sono stati adoperati 138 referee italiani e 5 referee stranieri per gestire 132 domande di ricerca. Ogni domanda è stata inviata a 8 referee, dei quali almeno uno straniero, e ha avuto risposta da un minimo di 5 referee. Il Comitato scientifico ha operato sia nella fase istruttoria che nella fase di scelta definitiva attraverso svariate riunioni in cui le decisioni sono state sempre prese all'unanimità. Sono state accettate 65 proposte [poco meno del 50% delle proposte presentate, con un finanziamento medio di 75 milioni per unità operativa (UO)]. Il sistema di revisione è stato confidenziale ma trasparente per gli autori, ai quali è stato sempre trasmesso ogni parere dei referee. Ampia parte nella gestione del progetto hanno avuto gli incontri con i ricercatori delle UO selezionate e sono state favorite tutte le collaborazioni positive fra di essi, talché molte unità sono integrate e svolgono ricerche multicentriche, in particolare quelle riguardanti la tubercolosi negli immigrati, la standardizzazione delle tecniche di diagnosi molecolare e alcuni protocolli terapeutici. Le azioni concertate hanno riguardato: 1) valutazione del rischio dell'acquisizione della malattia tubercolare fra gli immigrati in Italia; 2) "survey" della multi-resistenza in Italia; 3) diagnosi molecolare e sua applicazione in clinica.

Ci sono stati finora due workshop per valutare e discutere obiettivi e metodi delle

ricerche approvate e per una prima disamina dei risultati ottenuti. La gestione del progetto è in attiva comunicazione ed integrazione con l'esterno, cui vengono continuamente fornite informazioni circa la struttura del progetto, le metodologie impiegate e i risultati attesi. Il progetto è diventato un centro di riferimento nazionale nella lotta alla tubercolosi e ha avuto anche ampio risalto pubblico, in particolare durante le celebrazioni della giornata mondiale della tubercolosi (24 marzo). Esistono speciali rapporti con l'OMS, che ha chiesto al progetto di costituire un centro di riferimento e controllo di qualità per la diagnostica microbiologica e per altri programmi di controllo e ricerca. In particolare, l'OMS ha recentemente designato l'Istituto come centro sopranazionale di riferimento per il controllo delle multiresistenze nella terapia della tubercolosi. Con questo avallo, il centro, insieme alla rete di laboratoristi e clinici di varie associazioni scientifiche, in particolare dell'Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO), nonché di alcune unità operative del PNT, ha pertanto organizzato per il 1998 il primo "survey" nazionale delle multiresistenze che servirà a documentare la reale entità di questo grave fenomeno nel nostro paese e a fornire strumenti idonei a combatterlo in tutto il territorio. Inoltre, il progetto è fortemente impegnato a gestire altre cosiddette "azioni concertate" sul territorio nazionale, che coinvolgono in maniera interdisciplinare varie UO del progetto stesso, per:

a) l'elaborazione di linee guida per l'uso della diagnostica molecolare di tubercolosi in laboratorio e clinica;

b) l'indagine multicentrica nazionale sulla tubercolosi negli immigrati, avente soprattutto lo scopo di verificare e quantificare l'attuale rischio di acquisizione e diffusione

della malattia tubercolare nelle diverse popolazioni di immigrati in Italia.

Entrambe queste azioni, da completarsi nel 1998 - primavera 1999, individueranno gli strumenti più idonei a sostenere una rapida diagnosi e conseguente efficace trattamento della tubercolosi, nonché di valutare con accuratezza su quali gruppi di immigrati e situazioni di vita degli stessi è necessario concentrare le risorse per efficaci interventi di prevenzione.

*Attività di ricerca delle unità operative: primi risultati.* - Sia pure in un breve lasso di tempo, sono già parecchi i risultati ottenuti dalle diverse UO finanziate dal progetto e pubblicati per lo più in riviste internazionali di elevata qualificazione. Sinteticamente, si segnalano:

a) Rx del torace non è una procedura *cost-effective* per la prevenzione della tubercolosi.

b) *Spoligotyping* è una metodica per tipizzare i ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) molto discriminativa ed economica.

c) Un nuovo metodo di PCR diagnostica, altamente specifico e capace di rilevare 1-2 micobatteri per campione.

d) *M. tuberculosis* induce morte cellulare programmata nel macrofago. Il controllo di questo evento può risultare terapeuticamente importante.

e) *M. tuberculosis* favorisce la replicazione di HIV. Meccanismi di questo "enhancement" e modalità di blocco di esso.

f) Conferma che la produzione di IFN- $\gamma$  è critica per lo sviluppo di immunità protettiva antitubercolare a livello polmonare.

g) *M. tuberculosis* è ucciso da alcune tossine di lievito e da anticorpi antiidiotipici mimanti l'azione della tossina "killer". Può costituire un innovativo approccio terapeutico.

h) Epitopi peptidici del complesso antigenico P85.

i) Costruzione di "libraries" combinatoriali che producono anticorpi monoclonali umani contro antigeni micobatterici. Potranno essere utili sia in diagnostica che in terapia.

j) Alcuni meccanismi delle multiresistenze ai farmaci antitubercolari.

k) Nuovo metodo (PCR competitiva) per valutare rapidamente la sensibilità di *M. tuberculosis* agli antibiotici, fondamentale per un trattamento efficace.

l) Costruzioni di complessi genici e proteici per nuovi vaccini antimicobatterici. Il progetto è fortemente impegnato in quest'area e solleciterà per il 1998 un'azione concertata fra tutte le UO attive direttamente o indirettamente in questo settore per lo sviluppo di un nuovo, efficace vaccino antitubercolare.

E' in corso la raccolta documentale di tutte le pubblicazioni effettuate dalle UO con sostegno dei fondi del PNT. Finora ne sono state segnalate una cinquantina, di cui circa 40 con *Impact factor* > 3.0.

#### *Attività del Centro ISS per la multiresistenza ai farmaci antitubercolari*

*Attività iniziali di laboratorio e preparazione del Centro.* - E' stata metodologicamente impostata ed iniziata l'attività del Centro ISS per la multiresistenza ai farmaci antitubercolari.

Sono stati completamente analizzati ceppi inviati da laboratori periferici e risultati resistenti ad uno o più farmaci con altre metodiche. E' stato confermato che l'86,2% dei ceppi analizzati è risultato resistente ad almeno 2 farmaci e il 5,4% dei ceppi è risultato resistente a 5 o più farmaci. La resistenza più diffusa era quella verso

l'isoniazide (89% dei ceppi), ma resistenze per streptomina, rifampicina e rifabutina erano anche largamente rappresentate (51%, 60% e 60%, rispettivamente). Il centro è in grado di confermare l'identificazione dei micobatteri tubercolari (e non) mediante i metodi biochimici tradizionali oppure utilizzando sonde molecolari del commercio specifiche per *Mycobacterium tuberculosis* complex e *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. Infine, il Centro è stato inserito dall'OMS nella rete dei centri soprannazionali per il monitoraggio della resistenza ai farmaci antitubercolari. In questa veste, ha avviato e promosso il controllo di qualità microbiologica dei laboratori coinvolti nella diagnosi di tubercolosi e nella determinazione della suscettibilità ai farmaci antitubercolari.

*Studio dell'epidemiologia molecolare della farmaco-resistenza mediante RFLP.* - I ceppi di MTB MDR possono essere tipizzati mediante un protocollo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) messo a punto da vari gruppi. Al momento, la tecnica che usa la sequenza di inserzione IS6110 come sonda specifica è stata applicata su 44 ceppi e ha permesso di dimostrare in alcuni casi il coinvolgimento di uno stesso stipite MDR sia in infezioni avvenute nella stessa città che in città diverse. E' anche stato messo a punto un metodo non radioattivo di marcatura per RFLP. Tale metodo si basa sull'uso di digossigenina, un aptene steroideo, che può essere utilizzato per la marcatura e la rivelazione di DNA, RNA e oligonucleotidi. Le due metodiche vengono attualmente utilizzate in parallelo. Tali metodi sono stati messi a disposizione dei laboratori periferici interessati e partecipanti alle attività del progetto.

*Studio della patogenicità dei ceppi MDR.* - La patogenicità dei ceppi MDR può essere studiata sia in un modello di infezione nei macrofagi umani che in un modello di infezione in topo, determinando nel tempo il numero delle CFU (Colony Forming Unit) nei lisati macrofagici e negli organi (fegato, milza, polmone). Per la valutazione della patogenicità *in vivo* è stato necessario allestire un isolatore a contenimento totale mantenuto a pressione negativa, che viene utilizzato per la stabulazione degli animali e che è collocato presso il Servizio qualità e sicurezza della sperimentazione animale dell'Istituto. Per tutte le operazioni relative all'espanto degli organi e alla determinazione delle CFU è stato necessario procedere alla completa ristrutturazione della stanza "P3" del Laboratorio di Batteriologia e micologia medica dell'Istituto. Anche questa struttura e le relative competenze sono state messe a disposizione di vari gruppi collaboranti con l'ISS nell'ambito del PNT.

*Altre attività.* - E' in fase di attuazione lo studio per incarico del CEN (Comité Européen de Normalisation) sulla standardizzazione delle metodiche per il controllo dell'attività micobattericida dei disinfettanti. A tale studio partecipano laboratori in vari paesi (Francia, Italia, Regno Unito, Germania, Olanda, Svezia, Finlandia, Danimarca, Spagna).

*Epidemiologia e sorveglianza della tubercolosi*

*Sorveglianza della tubercolosi in Italia dal 1955 al 1995.* - Tutti i dati di notifica, di morbosità e di mortalità, a partire dal 1955 e pubblicati ufficialmente da varie fonti, sono stati analizzati e riuniti in un'unica pubblicazione, allo scopo di renderli disponibili

per chiunque voglia averne agevolmente accesso. Le informazioni riguardanti i casi riferiti agli anni 1992-1995 sono state individuali, non pubblicate, e utilizzate anche per la valutazione del nuovo sistema di notifica delle malattie infettive implementato nel 1991.

*Studio di epidemiologia molecolare sulla trasmissione della tubercolosi in pazienti con infezione da HIV-AIDS e nella popolazione.* - La tubercolosi è l'unica patologia associata all'HIV ad avere una potenziale ricaduta sulla popolazione generale; pertanto la conoscenza delle dinamiche di trasmissione della TBC tra la popolazione generale e i pazienti HIV+ offrirebbe preziose indicazioni nelle strategie di controllo. Lo studio si avvale di tecniche di biologia molecolare (*DNA-fingerprinting*) che permettono di stabilire se due ceppi di TBC isolati da due pazienti diversi siano identici oppure no. L'identità tra due ceppi suggerisce la recente trasmissione del bacillo da un soggetto all'altro e facilita, dunque, la ricostruzione della catena di trasmissione in occasione, ad esempio, di un focolaio epidemico. E' quindi iniziato uno studio delle modalità di trasmissione da persona a persona della TBC all'interno di una popolazione (area metropolitana di Milano) al fine di: 1) identificare i casi di recente infezione, nella popolazione generale e nei pazienti HIV+; 2) identificare i fattori di rischio associati; 3) valutare la frequenza e la circolazione di ceppi farmaco-resistenti. Lo studio è cominciato nel luglio 1995 e sta per terminare. Nel primo anno di studio (pazienti reclutati tra il luglio 1995 e il giugno 1996), di 277 casi arruolati circa il 20% sono pazienti AIDS e quasi un quarto sono immigrati. Complessivamente, la frequenza di ceppi multiresistenti (MDR-TB) è del 6,5 %, ma

è del 17% tra i pazienti AIDS. Infine, oltre la metà di questi ultimi sono associati in "cluster" contro solo un quarto dei soggetti senza infezione da HIV. Le modalità di trasmissione nei "cluster" verranno chiarite con indagini *ad hoc* che sono in corso.

*Indagine di un'epidemia di tubercolosi multiresistente a Milano.* - Su richiesta dell'Assessorato alla sanità della Regione Lombardia e della Direzione sanitaria dell'Ospedale "L. Sacco" di Milano, tra il 1995 e il 1996 sono state condotte due indagini epidemiologiche, nei due ospedali milanesi "Niguarda" e "Sacco", che hanno avuto come oggetto lo stesso ceppo di TBC che è circolato nei reparti di malattie infettive dei due ospedali e che è risultato resistente a isoniazide, rifampicina, streptomina, etambutolo. L'indagine ha messo in evidenza la trasmissione intraospedaliera del ceppo e ha reso possibile l'identificazione di numerosi casi di TBC multiresistente con lo stesso ceppo, individuato i fattori di rischio e ricostruito le modalità di diffusione del ceppo tra i due ospedali.

#### Formazione

La formazione è iniziata con corsi annuali e vari convegni, di diverso taglio ed indirizzati alle diverse figure dell'SSN e alla classe medica più generale. In particolare, il progetto ha organizzato in proprio e sponsorizzato i seguenti corsi e convegni:

a) Corso di formazione ISS per ufficiali medici su "Malattie infettive riemergenti". Roma, marzo 1995.

b) Corso di formazione ISS su "Aspetti di sanità pubblica della tubercolosi". Roma, maggio 1995.

c) Corso CEFAR/ATB su "Micobatteri: aspetti diagnostici". Milano, novembre 1996.

d) Corso di formazione ISS su "Aspetti di sanità pubblica della tubercolosi". Roma, dicembre 1996.

Numerose sono state le collaborazioni con Emilia-Romagna, Toscana, Umbria, Campania e Puglia per la realizzazione dei sistemi regionali di sorveglianza della TBC, e con la Lombardia per la realizzazione del sistema di sorveglianza della multiresistenza in regione.

Per il mese di ottobre 1998 è previsto un Corso avanzato sulla diagnostica microbiologica e clinica della TBC riservato a personale dirigenziale dell'SSN.

#### Consulenza e trasferimenti

Oltre alla generale consulenza sotto forma di pareri e diagnosi tipiche delle attività dell'Istituto, il Laboratorio di Batteriologia e micologia medica ha reso disponibili per le UO, e più in generale per l'SSN, ceppi di riferimento, altri materiali e metodi di indagine. In particolare, il Centro per le resistenze ha provveduto all'acquisto di ceppi standard da collezioni internazionali da distribuire ai laboratori che ne facciano richiesta. Molte unità periferiche sono routinariamente rifornite da questo centro.

L'elenco dei ceppi disponibili è riportato qui di seguito:

- 1) *M. tuberculosis* ATCC 27294 (TMC 102, H37Rv), sensibile ai farmaci antitubercolari primari e secondari;
- 2) *M. tuberculosis* ATCC 35820 (TMC 301, H37Rv, resistente a SM);
- 3) *M. tuberculosis* ATCC 35822 (TMC 303, H37Rv, resistente a INH);
- 4) *M. tuberculosis* ATCC 35828 (TMC 311, H37Rv, resistente a PZA);
- 5) *M. tuberculosis* ATCC 35837 (TMC 330, H37Rv, resistente a EMB);
- 6) *M. tuberculosis* ATCC 35838 (TMC 331, H37Rv, resistente a RIF);

7) *M. tuberculosis* ATCC 35801 (TMC 107, ceppo Erdman);

8) *M. tuberculosis* ATCC 25177 (ceppo H37Ra);

9) *M. bovis* BCG ATCC 27290 (ceppo Copenhagen);

10) *M. bovis* BCG ATCC 27291 (ceppo Pasteur);

11) *M. avium* ATCC 15769.

Antigeni micobatterici e metodologie d'indagine diagnostica con i relativi protocolli sono stati anche messi a disposizione delle UO del PNT.

#### Prospettive

Nei due anni di effettiva attività, il PNT ha già raggiunto lo scopo primario che era quello di creare una rete di ricercatori internazionalmente qualificati e competitivi nello studio di *M. tuberculosis* e della malattia tubercolare. Le UO del PNT sono sufficientemente numerose e hanno ognuna una sufficiente massa critica di risorse umane, conoscenze e risultati iniziali da garantire un adeguato impegno per migliorare la qualità scientifica degli interventi contro la malattia nel nostro paese. Tutte le principali associazioni scientifiche del settore e i gruppi accademici più competitivi sulla scena internazionale sono rappresentati nel PNT e l'ampio "panel" di epidemiologi, microbiologi, immunologi, patologi e clinici assicurano un attacco alla malattia in tutti i suoi aspetti. Inoltre in seno a questa comunità, sotto il decisivo indirizzo del Comitato scientifico del progetto, si sono avviate varie azioni di coordinamento e ricerche multicentriche che stanno già dando risultati applicativi di grande utilità, quali il controllo della TBC negli immigrati, linee guida per la diagnostica molecolare, il "survey" della multiresistenza nei ceppi di *M. tuberculosis* circolanti in Italia.

E' assolutamente indispensabile che la rete di competenza e di ricerca che si è creata continui a ricevere un adeguato supporto finanziario per poter portare a termine almeno un triennio di attività di ricerca e portare anche a conclusione le azioni coordinate intraprese. Se ciò non avvenisse, molte ricerche resterebbero nel guado e molto del pur notevole investimento effettuato andrebbe di fatto perduto.

Si ritiene che alla fine di un terzo anno di serio finanziamento (quantificabile in una cifra compresa fra i 3 ed i 4 miliardi) si potrà passare dalla fase di "chiamata a raccolta" delle UO ad azioni più mirate, individuate anche sulla base dei risultati raggiunti dalle migliori UO, e che consentano di tenere vivi almeno fino al duemila i più importanti obiettivi nell'eliminazione o, perlomeno, nel controllo della TBC nel nostro paese, che sono:

a) controllare le multiresistenze e incoraggiare le ricerche su nuovi farmaci antitubercolari;

b) assicurare una diagnosi tempestiva, sensibile e specifica, con metodi più precisi e rapidi di quelli tradizionali;

c) elaborare protocolli di intervento e controllo epidemiologico della TBC in speciali gruppi a rischio;

d) assicurare la massima adesione del paziente agli schemi terapeutici, anche dietro opportuna semplificazione degli stessi;

e) prevenire la malattia (e/o l'infezione) con un vaccino più efficace dell'attuale.

Almeno alcune di queste azioni potranno essere perseguite, con limitato impegno finanziario, nel biennio 1999-2000 attraverso un'adeguata selezione delle UO del PNT e una loro forte interazione con i gruppi di ricerca formati in Istituto.