

2.2.8. Sicurezza d'uso degli alimenti e medicina veterinaria

Prevenzione della diffusione di salmonelle e altri agenti, responsabili di tossinfezioni alimentari in allevamenti zootecnici. - E' stata valutata la capacità di recupero di alcuni metodi rapidi nella determinazione delle salmonelle. Sono stati studiati metodi che utilizzano terreni solidi di arricchimento selettivo, quali l'MSRV, tecniche immuno-enzimatiche e di biologia molecolare (probe, PCR). Inoltre sono stati avviati studi sull'igiene dell'uovo e sull'influenza in macronutrienti sulla resistenza delle salmonelle durante il processo produttivo dei mangimi.

Studio della trasmissione di germi patogeni nella catena alimentare e in particolare nella ristorazione collettiva. - Presso l'ISS è stato istituito il Centro nazionale per la diagnosi di botulismo (vedi Circolare ministeriale n. 9 del 1° luglio 1996). Dalla sua istituzione, sono stati sottoposti ad esame più di 150 sospetti casi di botulismo alimentare verificatisi nel triennio, in parte associati al consumo di prodotti alimentari industriali. Derivati del latte, tonno conservato, funghi sott'olio, olive dolci, patè di tartufo sono gli alimenti industriali che hanno provocato 17 casi di botulismo di cui uno mortale. Le cause della presenza di tossina botulinica in tali prodotti sono da ricondurre all'impiego di temperatura inadeguata durante la produzione e/o conservazione degli alimenti.

Sono stati inviati ai laboratori incaricati del controllo ufficiale i protocolli per lo screening analitico dei campioni alimentari industriali sopra citati nonché i criteri per l'identificazione del punto critico con cui valutare l'idoneità delle conserve vegetali.

L'Istituto è anche centro di coordinamento per la sorveglianza della listeriosi

alimentare. In tale veste è stato coinvolto nello studio dei fattori causali di un esteso episodio di gastroenterite che ha colpito più di 1000 bambini di alcuni distretti scolastici della provincia di Torino, identificando l'agente responsabile e le modalità dell'infezione. Sono altresì stati valutati alcuni metodi rapidi alternativi per la diagnosi e la valutazione di virulenza della *Listeria monocytogenes*.

Studi molecolari sul botulismo. - E' stato messo a punto un metodo di amplificazione *in vitro* (PCR) di segmenti specifici di geni che codificano le neurotossine botuliniche A, B, ed E. Con tale metodo si sono individuati geni silenti di tipo B in ceppi di *C. botulinum* tipo A. Il gene della tossina di tipo B non viene espresso a causa di alcune mutazioni all'interno della sequenza. E' stato dimostrato con un metodo messo a punto che tale delezione può essere evidenziata mediante due reazioni di PCR consecutive. E' stato altresì isolato ed identificato un raro ceppo di *C. botulinum* che possiede i geni delle neurotossine A e B e che produce contemporaneamente le due tossine.

Con la tecnica dell'amplificazione *in vitro* del gene della neurotossina C, si sono potuti altresì studiare casi di botulismo animale verificatisi tra la fauna di un'area protetta.

Identificazione di tossine DSP (diarrhoeic shellfish poisoning) e PSP (paralytic shellfish poisoning) trasmesse da organismi marini ai prodotti della pesca. - In seguito a ripetuti episodi di presenza di tossine algali nei molluschi è stato affrontato il problema della metodologie analitiche. In particolare, per la determinazione della DSP viene utilizzato ufficialmente il metodo biologico su topo, che però presenta limiti dovuti ad una notevole variabilità e a scarsa sensibili-

tà (1 mg AO/g epatopancreas); sono stati quindi messi a punto e valutati metodi alternativi. Il primo si basa sulla tossicità su colture cellulari di tali composti, che provocano modificazioni morfologiche in tempi variabili e strettamente dipendenti dalla concentrazione di tossina presente. L'altro si basa sull'utilizzo di un biosensore amperometrico basato su una reazione enzimatica che sfrutta la capacità dell'acido okadaico e dei suoi derivati di inibire la fosfatasi acida. Parallelamente sono stati condotti studi su ceppi batterici isolati da acqua di mare, molluschi e microalghe, allo scopo di individuare un loro probabile ruolo nella produzione di tossine tipo PSP o TTX.

Residui di farmaci veterinari: definizione dei limiti e metodologie di controllo. - E' stato messo a punto un metodo di screening per l'identificazione microbiologica di tetracicline, β -lattami, sulfamidici e streptomicine in diverse matrici alimentari. E' stata verificata l'applicazione della pepsina per rilevare la frazione legata con le proteine dei residui di sulfamidici e tetracicline nel latte. E' stato distribuito ai laboratori del controllo ufficiale un protocollo per la ricerca e l'identificazione di residui di alcuni antibiotici e di sulfamidici nel latte. E' stata verificata l'antibiotico-resistenza di ceppi di *L. monocytogenes* ad antibiotici utilizzati in terapia veterinaria.

Raccolta dati per la valutazione delle assunzioni di additivi e contaminanti con la dieta (Cooperazione UE). - La stima delle assunzioni di contaminanti con la dieta costituisce il momento centrale del processo di valutazione del rischio chimico a cui è esposta la popolazione attraverso l'alimentazione. In questo contesto, l'Unione europea ha istituito specifiche "task force" nell'ambito della cooperazione scientifica come supporto per il Comitato scientifico dell'alimentazione umana:

Task force 3.2.1. - Valutazione del rischio associato alle aflatossine;

Task force 3.2.2. - Valutazione del rischio associato all'ocratossina A;

Task force 3.2.3. - Stima dell'assunzione di cadmio con la dieta;

Task force 3.2.1. - Stima dell'assunzione di nitrati nei prodotti vegetali.

L'Italia ha partecipato in qualità di coordinatore, relativamente alla "task" sul cadmio, e come partecipante alle altre "task". Sono stati raccolti e valutati i dati concernenti i livelli di presenza negli alimenti e quelli relativi ai consumi alimentari e sono state stimate le assunzioni dei diversi contaminanti con la dieta, valutando l'esposizione all'uomo attraverso il confronto con le dosi accettabili stabilite dalle autorità scientifiche internazionali.

3. RICERCA

L'attività di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità è stata fondata su programmi costruiti entro linee autonomamente proposte e discusse tra le varie componenti che operano nell'Istituto e validate dal Comitato scientifico. Le ricerche, fin dalla metà degli anni '80, sono state organizzate in un sistema di piani quinquennali (Ambiente; Farmaci; Patologia infettiva; Patologia non infettiva; Pianificazione e valutazione dei servizi sanitari; Sicurezza d'uso degli alimenti) che hanno consentito il conseguimento di risultati scientifici di rilievo.

E' opportuno sottolineare come l'attività di ricerca, pur originando da linee autonomamente proposte dai ricercatori, abbia avuto la sua genesi nelle attività di servizio che l'Istituto è chiamato a svolgere nell'ambito del Servizio sanitario nazionale.

Il 1996, che deve essere considerato un anno di transizione, è stato dedicato sia al completamento delle linee di ricerca afferenti al piano quinquennale 1991-1995, sia alla programmazione dei nuovi progetti triennali che il Comitato scientifico ha discusso ed approvato nel corso del 1997.

L'esperienza maturata negli scorsi anni con i tradizionali progetti di ricerca d'Istituto ha suggerito di limitare la durata dei

progetti a tre anni e di stimolare la presentazione delle nuove proposte di ricerca non all'interno di un quadro pre-formato di progetti e sottoprogetti ma all'interno delle grandi aree tematiche derivanti dai bisogni sanitari del paese, identificate sia dal Piano sanitario nazionale che dai programmi di ricerca biomedici e ambientali dell'Unione europea.

Le principali aree tematiche identificate sono:

- Area 1: Farmaci
- Area 2: Tecnologie biomediche
- Area 3: Disturbi mentali e neurologici
- Area 4: Tumori
- Area 5: Malattie infettive e parassitarie
- Area 6: Malattie metaboliche, cronico-degenerative e cardiovascolari
- Area 7: Genetica umana
- Area 8: Sangue
- Area 9: Salute della popolazione e servizi sanitari
- Area 10: Salute e ambiente
- Area 11: Radiazioni
- Area 12: Alimenti, nutrizione e sanità pubblica veterinaria
- Area 13: Garanzia della qualità
- Area 14: Altro (formazione, bioetica, ecc.)

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^a 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^a 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 (endemico 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 sangue 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 IC 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 Parvius 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 mobilitazione 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. E' 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 genetico-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'eziopatogenesi 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;