

- 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- γ 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 streptomycin, 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 sopranazionali 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 Copenaghen);

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.

3.1.5 Epatite virale

Il progetto "Epatite virale" è stato avviato dall'Istituto Superiore di Sanità nel 1995, in relazione all'applicazione del DM 4/11/1994, secondo le procedure dettate dal DLvo del 30 dicembre 1992 n. 502, con la finalità di promuovere e coordinare, a livello nazionale, le ricerche nel campo dei virus dell'epatite e delle infezioni ad esse correlate.

L'opportunità dell'attuazione di questo progetto è stata dettata dall'importanza che le patologie correlate alle infezioni dai differenti virus dell'epatite rivestono in Italia sia in termini di morbilità che di mortalità. Infatti, ogni anno vengono notificati circa 10 000 casi di infezioni acute e si stima che vi sia un uguale numero di morti per cirrosi ed epatocarcinoma. Ciò comporta un notevole impatto a livello sanitario che si esplica con il coinvolgimento dei settori relativi alla clinica e terapia e dei settori relativi alla profilassi.

Sebbene la diminuzione di incidenza nelle infezioni acute potrà avere in futuro effetti anche sulla presenza di epatopatie croniche, permangono oggi elevati valori di prevalenza e un vasto serbatoio di individui "carriers" per quelle infezioni da virus epatitici che danno luogo a persistenza virale, quali le infezioni da virus dell'epatite B e da virus dell'epatite C.

Particolare importanza riveste, pertanto, l'individuazione di specifici programmi di ricerca e un fondamentale ruolo, nell'ambito dei settori impegnati, spetta sia alla ricerca virologica ed epidemiologica di base che a quella applicata in campo diagnostico. Tali ricerche costituiscono gli elementi di fondamento e i punti di partenza per i successivi studi ed interventi di tipo profilattico e terapeutico.

Un notevole incremento delle conoscenze è stato ottenuto negli ultimi anni grazie al

positivo apporto di varie discipline, quali la biologia molecolare e l'immunologia e grazie all'apporto dei settori biotecnologici. Tale sviluppo ha portato alla caratterizzazione di nuovi agenti virali.

Il progetto è stato basato sull'attuale stato delle acquisizioni scientifiche e tecnologiche che lasciano non definiti alcuni settori delle conoscenze. E' stato in particolare considerato che: a) una quota di infezioni epatitiche di tipo sporadico non sono ancora definibili eziologicamente; b) i virus epatitici di recente identificazione, quali il virus dell'epatite C, dell'epatite E e dell'epatite G non sono a tutt'oggi caratterizzati biologicamente; c) per i virus di antica caratterizzazione (HBV, HDV), nuove problematiche sono emergenti anche in relazione all'identificazione di varianti virali con possibile diverso significato patogenetico; d) i processi patogenetici correlati alle infezioni da virus dell'epatite e alle sindromi ad esse associate sono argomento di attiva ricerca; e) nuovi problemi metodologici e di interpretazione diagnostica si sono aperti in relazione al progresso tecnologico in corso nel settore del rilevamento virale e anticorpale a scopo diagnostico.

In particolare, in questo ambito, l'inserimento di competenze da parte dei gruppi di ricerca biotecnologici, frequentemente connessi alle industrie produttrici di diagnostici e di reagenti biologici, ha portato ad uno sviluppo applicativo che necessita tuttavia di valutazioni controllate.

Pertanto nel progetto sono stati presi in considerazione i differenti aspetti epidemiologici, virologici e patogenetici attualmente rilevanti ai fini della diagnosi, della profilassi e della terapia di tali infezioni con i seguenti obiettivi specifici: 1) migliorare le conoscenze sulle modalità di trasmissione per i virus a trasmissione parenterale; 2)

individuare specifiche misure di prevenzione non immunitaria; 3) migliorare la copertura vaccinale anti-HBV dei gruppi a rischio; 4) migliorare le conoscenze sulla struttura e la biologia di nuovi virus epatitici; 5) migliorare le conoscenze sulla patogenesi dell'infezione virale; 6) sviluppare e controllare metodi di identificazione e caratterizzazione dei marcatori di infezione virale, la loro evoluzione e il significato diagnostico e prognostico.

Il progetto è stato articolato in:

a) Una sezione di epidemiologia, sviluppata presso il Reparto "Epidemiologia clinica" del Laboratorio di Epidemiologia e biostatistica dell'ISS, che comprende:

i) attività di sorveglianza epidemiologica delle epatiti virali acute (SEIEVA);

ii) studi coordinati sull'epidemiologia e prevenzione delle infezioni a trasmissione parenterale e sul controllo delle vaccinazioni anti-epatite B.

b) Una sezione relativa allo studio dell'eziopatogenesi e diagnosi virale sviluppata presso il Reparto "Infezioni da virus epatitici" del Laboratorio di Virologia dell'ISS che comprende:

i) attività di ricerca in relazione allo studio degli aspetti strutturali, biologici e patogenetici dei virus dell'epatite. Tale attività ha sviluppi applicativi e di controllo inerenti: la standardizzazione e il controllo di metodologie specifiche particolarmente applicabili nella diagnosi delle infezioni, la consulenza al Ministero della Sanità e alle strutture del Servizio sanitario nazionale in tali settori e nel settore della profilassi delle infezioni da virus epatitici;

ii) attuazione di "Call for proposals" a livello nazionale con lo scopo di aggregare specifiche competenze e di identificare centri preferenzialmente operanti nel campo della ricerca biologica e clinica sui virus epatitici.

Per l'intero progetto sono stati finora stanziati ed impegnati in relazione ai fondi del 1993 - 2400 milioni, per il 1994-1995 - 1600 milioni e per il 1996 - 500 milioni.

Attività svolta

Il programma è stato sviluppato, con l'utilizzazione dei fondi relativi al 1993 e al 1994-1995, mediante lo svolgimento di attività intramurali e di attività coordinate con centri esterni (azioni coordinate, bando di ricerca).

Sezione di epidemiologia. - Nell'ambito delle attività intramurali, è proseguito il programma di sorveglianza delle epatiti virali acute a cui aderiscono 129 aziende sanitarie che comprendono il 46% della popolazione nazionale. Tale sistema di sorveglianza ha dato la possibilità di seguire l'andamento nel tempo dei diversi tipi di epatiti virali e di studiare il ruolo che giocano, nella realtà italiana, i singoli fattori di rischio. Tali elementi sono stati utilizzati per formulare strategie di prevenzione. Il SEIEVA ha fornito, inoltre, dati utili anche per capire l'andamento della vaccinazione anti-epatite B nei soggetti conviventi di portatori cronici di HBsAg, nel personale sanitario, e negli adolescenti. Sul problema specifico delle vaccinazioni è stata attivata un'azione coordinata.

Sono stati condotti studi sieroepidemiologici sulla diffusione del virus HCV tra le reclute dell'aviazione e in gruppi di popolazione.

Dal 1995 ad oggi sono apparsi 18 contributi (14 su riviste a livello internazionale e 1 a livello nazionale e 3 rapporti tecnici).

Nell'ambito delle azioni coordinate di epidemiologia, sono state avviate le azioni coordinate che seguono:

- valutazione del rischio di infezione da HBV e HCV in ambienti odontoiatrici,

valutazione e promozione della vaccinazione anti-epatite B nei gruppi a rischio;

- valutazione del rischio di infezione da virus dell'epatite di tipo B e di tipo C a seguito di interventi chirurgici;

- studio dell'infezione da HCV nei centri di dialisi;

- trial clinico controllato sull'efficacia del vaccino anti-epatite A, nella trasmissione secondaria dell'infezione dopo esposizione a contatti con conviventi affetti da epatite acuta.

Nell'ambito degli studi effettuati per la valutazione dell'applicazione delle procedure standard per la prevenzione delle infezioni da manovre invasive in ambiente odontoiatrico nelle regioni Emilia-Romagna e Campania, è stato visitato un campione di strutture odontoiatriche in tali regioni. I risultati attualmente disponibili si riferiscono all'Emilia-Romagna. Le prove di sterilità eseguite in 89 studi hanno mostrato che il 26% dei ferri sottoposti a trattamento di "sterilizzazione" non era in realtà sterile. Gli operatori dei servizi di igiene pubblica hanno unanimemente riferito che la realizzazione dello studio ha indotto un miglioramento nella corretta conduzione igienico-sanitaria delle strutture odontoiatriche, con l'adozione di attrezzature più adeguate (autoclavi a vapore con pre-vuoto, indicatori di sterilizzazione, ecc.), e il consolidamento di un rapporto sinergico tra i servizi di prevenzione e professionisti.

In base agli studi effettuati in alcuni ospedali della Campania sul rischio di infezione da virus dell'epatite di tipo B e di tipo C a seguito di interventi chirurgici, nessuna sieroconversione è stata messa in evidenza durante il periodo di osservazione e si ritiene necessaria l'applicazione di studi di tipo caso-controllo per una esatta valutazione del rischio.

Lo studio multicentrico sull'infezione da virus dell'epatite C in dialisi è stato condotto presso 32 centri di dialisi delle regioni Emilia-Romagna, Puglia e Basilicata. La prevalenza di pazienti con anticorpi anti-HCV è risultata del 33%. I risultati preliminari dello studio hanno mostrato che la politica di isolamento in stanze separate dei pazienti anti-HCV positivi non risulta associata a minori prevalenze di positività per l'HCV. Attualmente non sono ancora disponibili i dati di incidenza di tale infezione.

Il trial clinico controllato sull'efficacia del vaccino anti-epatite A nella trasmissione secondaria dell'infezione dopo esposizione al contatto con un convivente con epatite acuta ha incluso al momento attuale 191 soggetti vaccinati e 196 controlli (su oltre 650 individui eleggibili, di cui però circa il 35% è risultato immune). Di essi, rispettivamente 148 e 151 hanno concluso il periodo di follow-up. L'analisi dei dati verrà eseguita alla fine dello studio.

Gli studi messi in atto per la valutazione della copertura vaccinale anti-epatite B dopo somministrazione del vaccino sono stati finalizzati alla raccolta dei dati sulle vaccinazioni effettuate. In particolare, è stato messo in evidenza che: a) oltre il 90% delle donne in gravidanza effettua lo screening per HBsAg; b) solo il 55% dei nati da madri HBsAg positive ha seguito una corretta applicazione della schedula vaccinale (immunoglobuline alla nascita e vaccino entro la prima settimana di vita; c) oltre l'80% dei dodicenni esaminati aveva effettuato la vaccinazione e in alcune aree nelle regioni meridionali la copertura vaccinale risulta inferiore a tale valore (65%); d) bassi valori di copertura vaccinale sono presenti nel personale sanitario (66% al nord e 33% al sud).

Sezione di virologia. - Nell'ambito delle attività intramurali è stata svolta:

a) Attività di ricerca nel campo dell'eziopatogenesi e diagnosi delle infezioni da virus epatitici. Tale attività è stata riferita allo studio delle caratteristiche strutturali, replicative e di variabilità genetica virale che presentano implicazioni con la patogenesi e diagnosi delle infezioni da virus delle epatiti di tipo A, B e C.

In particolare le ricerche hanno riguardato:

- lo studio dei meccanismi di epatocarcinogenesi correlati all'infezione da virus dell'epatite B mediante l'applicazione del modello animale WHV/*Marmota monax*;

- lo studio, in modelli animali, della variabilità del virus dell'epatite di tipo B e la valutazione dell'attività di composti antivirali;

- la caratterizzazione genomica e lo studio della variabilità del virus HCV e delle relative implicazioni epidemiologiche e diagnostiche;

- lo sviluppo di sistemi di espressione *in vitro* per lo studio delle funzioni di proteine di HCV ed HAV e del loro ruolo nella citopatogenesi virale.

Tali attività hanno dato luogo dal 1995 ad oggi a 45 contributi (29 apparsi su riviste internazionali, 12 comunicazioni presentate a congressi e 4 rapporti tecnici).

b) Attività di coordinamento e supporto tecnico-scientifico, aggiornamento tecnico-scientifico e supporto diagnostico per il Ministero della Sanità e per le strutture dell'SSN nel campo della diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite A, B, C, D, E, ecc.

Tali attività hanno riguardato:

- l'effettuazione di saggi specializzati, per cui non sono disponibili kit commerciali, quali: saggi di amplificazione genica per

particolari regioni del genoma virale e/o dotati di elevata sensibilità, saggi di caratterizzazione virale mediante clonaggio e analisi filogenetica delle sequenze; tali saggi devono essere applicati in alcuni casi specifici, ivi incluse l'identificazione della positività nei casi di bassa concentrazione virale e l'identificazione della sorgente di infezione mediante valutazione di campioni patologici e/o ambientali;

- standardizzazione di metodi e preparazione di campioni di riferimento;

- sviluppo di metodologie diagnostiche;

- pareri nel campo delle metodologie e dei protocolli diagnostici (definizioni di linee guida);

- organizzazione di "Seminari di aggiornamento sull'epatite da HCV: diagnosi, epidemiologia e terapia" (nel 1995 e nel 1997); tali seminari sono rivolti a medici e biologi che operano in qualità di responsabili presso le strutture dell'SSN deputate alla diagnostica, terapia e prevenzione delle epatiti virali; in particolare, vengono riportate le recenti acquisizioni disciplinari per quanto concerne gli aspetti virologici e patogenetici dell'HCV.

Nell'ambito delle attività di coordinamento di gruppi di ricerca esterni è stata data attuazione ad un bando di ricerca sul tema: "Eziopatogenesi e diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite". Tale bando ha incluso i seguenti obiettivi di ricerca:

- 1) caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali;

- 2) patogenesi dell'infezione virale persistente da virus epatitici;

- 3) marcatori di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti.

Il bando è stato pubblicato sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* del mese di settembre 1995 (con scadenza 11 dicembre

1995). Le proposte pervenute (82) sono state valutate da tutti i componenti del Comitato scientifico e sono state inviate a 53 referee italiani e stranieri (5 referee per ogni proposta). Il Comitato scientifico si è riunito per la valutazione il 13 febbraio 1996. Sono state prese in esame le 402 schede anonime inviate dai referee, e sono stati espressi i giudizi definitivi con l'applicazione di criteri "*ad hoc* definiti" e comunque analoghi a quelli già adottati in altri progetti dell'ISS.

L'attuazione del bando "Epatiti virali: eziopatogenesi e diagnosi" ha globalmente messo in evidenza un elevato livello tecnico-scientifico delle proposte pervenute che hanno avuto un buon parere da parte dei referee italiani e stranieri nel 78% dei casi. La Commissione ha espletato un'ulteriore selezione delle proposte, basate sulle caratteristiche di originalità e rispondenza agli obiettivi specifici del progetto. Sono state approvate il 36% delle proposte tenendo, inoltre, in considerazione il grado di fattibilità, nei tempi previsti dal progetto, e l'elevata e pluriennale esperienza sull'argomento, dei proponenti.

Sono state approvate 30 proposte (pubblicate in un rapporto) ripartite nei vari sottoprogetti secondo la Tabella 11.

Per la valutazione dei risultati delle ricerche è stato organizzato presso l'ISS, in data 29 settembre - 1 ottobre 1997, un convegno specifico che ha visto la partecipazione di tutti i gruppi finanziati. Sono state effettuate le relazioni orali inerenti all'attività dei progetti sotto forma di presentazione tecnica dettagliata dei risultati delle singole linee (1-3 presentazioni per progetto). Gli abstract di tali relazioni sono stati oggetto di un rapporto dell'ISS.

I principali risultati ottenuti nel corso del 1996-1997 sono di seguito riassunti per sottoprogetto.

Caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali. - Lo studio di varianti virali ha costituito una delle principali tematiche affrontate. L'analisi della eterogeneità genomica dell'HBV in pazienti con epatite fulminante (FH) ha messo in evidenza una frequente associazione di una particolare

Tabella 11. - Proposte pervenute e finanziate per sottoprogetto

Sottoprogetto	Proposte pervenute N.	Stanziamiento proposto (ML)	Proposte finanziate N.
1 Caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali	30	450	10
2 Patogenesi dell'infezione virale persistente di virus epatitici	35	420	12
3 Marcatore di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti	17	330	8
Totale	82	1200	30

variante virale, difettiva della regione pre-S2, con questo tipo di epatite, suggerendo un suo possibile ruolo patogenetico.

Lo studio di 175 soggetti infettati con HBV e sottoposti a trapianto di fegato ha suggerito che la somministrazione periodica di immunoglobulina anti-HBV (HBIG), stabilita per ridurre il rischio di reinfezione post-trapianto, può portare alla selezione di mutanti nella regione S che, sfuggendo alla neutralizzazione da parte dell'HBIG, possono causare epatite acuta.

L'espressione delle proteine strutturali dell'HCV in sistemi eucariotici e procariotici ha messo in evidenza un possibile ruolo patogenetico della proteina "core" e della glicoproteina E1 nel corso dell'infezione. In particolare, i risultati ottenuti suggeriscono che l'espressione intracellulare della proteina "core" rende le cellule sensibili alla apoptosi Fas-mediata. Inoltre è stato osservato che l'interazione della proteina E1 con le membrane cellulari è in grado di produrre modificazioni della permeabilità, suggerendo che tale proteina possa funzionare come canale ionico e influenzare l'omeostasi della cellula infetta.

Una serie di risultati sono stati ottenuti nell'ambito delle infezioni da HAV e HEV. Lo studio della sieroprevalenza di HAV e HEV (in un paese endemico quale l'Egitto) ha rilevato un differente pattern di distribuzione relativamente all'età, che causa un alto tasso di infezioni primarie durante le fasi precoci della vita per entrambi i virus. Inoltre, l'allestimento di vari sistemi cellulari per la coltivazione dell'HEV ha dimostrato la possibilità di replicare questo virus in almeno una delle colture esaminate.

L'analisi molecolare della replicazione di HAV ha messo in evidenza che mutazioni nella regione 5'-non codificante possono essere responsabili di una *down-regulation*

della traduzione e possibilmente spiegare la maggiore "lentezza" del ciclo replicativo. Inoltre, studi di espressione della proteina 3A di HAV hanno dimostrato una relazione tra la sequenza aminoacidica e la capacità di formare pori nelle membrane cellulari.

Patogenesi dell'infezione virale persistente di virus epatitici. - La comprensione dei meccanismi patogenetici che operano nelle infezioni persistenti da virus epatitici ha focalizzato l'interesse di varie discipline con rilevanti prospettive. Importanti risultati sono stati ottenuti in studi sulla caratterizzazione funzionale della proteina pX di HBV. La pX è un transattivatore della trascrizione possibilmente coinvolto nello sviluppo di epatocarcinoma. Nel corso degli studi condotti è stata dimostrata l'induzione da una fase di arresto cellulare di una fase di sintesi. Inoltre, dopo l'espressione prolungata di pX, è stata osservata l'apoptosi p53-mediata.

Gli studi immunologici hanno suggerito una serie di informazioni riguardanti le caratteristiche funzionali delle cellule T epatiche nel corso dell'infezione da HBV e HCV, visto che il pattern di citochine presente al sito di infezione può profondamente influenzare l'andamento finale della malattia epatica.

L'emergenza di un nuovo filone di ricerca ha messo in evidenza un'associazione significativa tra infezione da HCV e malattie linfoproliferative, suggerendo che l'infezione di sedi extraepatiche da parte dell'HCV può innescare meccanismi di trasformazione cellulare.

L'analisi dei mutanti HBV, difettivi per l'antigene E (HBeAg), ha suggerito che la patogenesi dell'infezione HBV è strettamente correlata al rapporto quantitativo tra virus selvaggio e virus mutato, la cui varia-

zione modifica il livello di espressione dell'HBeAg.

Gli studi sulla variabilità genomica dell'HCV all'interno della regione ipervariabile 1 (HRV1) hanno ribadito l'importanza di questa regione per lo sviluppo della persistenza. I dati presentati hanno infatti suggerito che la variabilità dell'HRV1 ha un significato adattativo, di risposta alla pressione del sistema immune. Inoltre la regione è altamente immunogenica e mantiene specifiche cellule della memoria. La presenza di cellule della memoria associata ad un andamento benigno dell'infezione in pazienti trattati con α -IFN suggerisce che la risposta immune verso questa regione potrebbe contribuire alla limitazione del danno epatico.

Marcatori di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti. - La valutazione dei marker di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti rappresenta una delle tematiche affrontate nell'ambito del progetto "Epatiti virali".

I risultati di ricerche condotte da più di un gruppo dimostrano chiaramente che il trapianto di fegato costituisce un modello sperimentale prezioso per lo studio dell'infezione da HCV. I dati presentati hanno infatti dimostrato che la reinfezione del fegato è un evento comune nei pazienti HCV positivi. La valutazione di parametri virologici e clinici post-trapianto apre la possibilità di esplorare i meccanismi responsabili del danno epatico nelle fasi iniziali dell'infezione, oltre a fornire indicazioni prognostiche e strategie di trattamento da adottare. Da uno studio preliminare su questa categoria di pazienti sono emersi inoltre risultati interessanti sulla risposta anticorpale anti-HCV nel periodo post-trapianto, ribadendo l'unicità del modello a disposizione per studiare l'instaurarsi della persistenza virale.

L'esame dei marcatori virologici in particolari categorie di pazienti a rischio di infezione da HCV (e/o HGV), quali emodializzati, politrasfusi e riceventi trapianto di rene e midollo osseo, ha fornito indicazioni sulla prevalenza dell'infezione, i fattori di rischio e il contributo di differenti genotipi.

I pattern virologici analizzati in pazienti con infezione multipla HBV/HCV hanno indicato una maggiore severità della manifestazione clinica in questo tipo di infezioni. La raccolta dei dati, ancora in corso, permetterà di valutare il decorso della malattia in rapporto ai pattern virologici esaminati.

In base alla valutazione dei dati ottenuti dalle ricerche finanziate nell'ambito dei tre sottoprogetti, e in considerazione del fatto che il bando ha richiesto l'inserimento della ricerca in una proiezione pluriennale e che gli obiettivi specifici possono essere proficuamente raggiunti solo con una prosecuzione del finanziamento per almeno due anni successivi, si è ritenuto di dover assegnare, per il proseguimento delle ricerche selezionate nell'ambito del "Call for proposals", 1000 milioni, dai fondi del progetto previsti per il 1994-1995 (Totale: 1600 milioni).

La proposta di assegnazione di questi fondi è stata effettuata dopo la valutazione del Comitato scientifico di progetto (riunione del 1° ottobre 1997), tenendo in considerazione i resoconti dell'attività relativa al primo anno.

E' stato proposto di rifinanziare 28 gruppi di ricerca ripartiti secondo la Tabella 12.

Per alcune tematiche è stata proposta l'aggregazione dei gruppi operanti nel settore e in particolare: 1) per gli studi sull'evoluzione patogenetica delle infezioni da virus dell'epatite in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Tali pazienti possono costituire un modello per la definizione del

Tabella 12. - Proposte pervenute e finanziate per il secondo anno di attività del progetto

Sottoprogetto	Proposte pervenute N.	Finanziamento richiesto (ML)	Proposte finanziate N.	Stanziamento proposto (ML)
1 Caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali	10	720	10	410
2 Patogenesi dell'infezione virale persistente di virus epatitici	12	832	11	360
3 Marcatori di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti	7	440	7	230
Totale	29	1992	28	1000

ruolo della risposta immune nell'eziopatogenesi dell'epatite di tipo C; 2) per gli studi sulla caratterizzazione di varianti virali allo scopo di raggiungere numerosità significative; 3) per lo sviluppo di tecnologie avanza-

te nell'ambito del rilevamento e della diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite anche allo scopo del mantenimento di strutture in grado di operare in eventuali situazioni di emergenza.