

zionare le conoscenze acquisite dagli operatori che hanno svolto corsi precedentemente:

- Giornata di aggiornamento sugli interventi nelle case alloggio per persone con AIDS, 10 ottobre 1997.

- Giornata di aggiornamento sul counselling per la modifica dei comportamenti sessuali a rischio e la prevenzione dell'infezione da HIV nei giovani, 14 ottobre 1997.

- Giornata di aggiornamento sulle tecniche dell'automutuoaiuto nelle dipendenze e nella sieropositività, 20 ottobre 1997.

- Giornata di aggiornamento per medici di medicina generale sulle infezioni da HIV, 29 ottobre 1997.

Sono stati inoltre realizzati i seguenti 4 corsi periferici:

- Corso di formazione per operatori della linea verde AIDS. Salerno, 10-13 febbraio 1997.

- Corso di formazione sul counselling sociosanitario sulle infezioni da HIV. Trapani, 7-14 aprile 1997.

- Corso di formazione per operatori delle case famiglia. Sassari, 12 aprile - 5 luglio 1997.

- Corso di aggiornamento sulle infezioni da HIV per operatori socio-sanitari. Pantelleria, 16-17 ottobre 1997.

Al termine del ciclo formativo 1997 gli operatori formati sono stati 805, così distribuiti: 325 operatori partecipanti ai corsi centrali, 287 operatori partecipanti alle giornate di aggiornamento e 193 operatori partecipanti ai corsi periferici.

2.1.3 Progetto di ricerca AIDS

Il primo progetto di ricerca sull'AIDS è stato avviato nel 1988 con l'intento di finanziare e coordinare i gruppi che autonomamente in Italia si erano attivati per svolgere ricerche nei diversi aspetti delle problematiche connesse con questa nuova sindrome.

Negli anni successivi al 1988 si è proceduto attivando, mediante il meccanismo del "Call for proposals", specifici bandi annuali con l'indicazione per grandi linee delle tematiche di ricerca per le quali veniva sollecitata la presentazione di proposte di ricerca. La formulazione dei bandi è stata annualmente approvata dalla Commissione nazionale per la lotta all'AIDS.

Gli obiettivi principali, che sono stati e sono alla base dell'istituzione dei progetti di ricerca sull'AIDS, mirano a: fornire uno stimolo e un finanziamento adeguato per lo sviluppo delle ricerche sull'AIDS che si ponessero a un livello competitivo con quelle svolte in altri paesi; promuovere, quando il caso, il coordinamento delle ricerche svolte da più gruppi per ottenere risultati più significativi; stimolare la mobilitazione di gruppi di ricerca impegnati in altri settori verso tematiche relative all'AIDS.

I programmi di ricerca sono stati articolati in sottoprogetti, che coprono diversi e rilevanti aspetti di ricerca di base e applicata. La formulazione dei sottoprogetti ha subito alcune modifiche nei vari progetti, anche in relazione con l'evoluzione delle conoscenze nei campi specifici e con l'istituzione di nuovi progetti *ad hoc*.

Attività svolta

VIII progetto 1995. - Nel corso del 1995 è stato reso operativo lo svolgimento dell'VIII

progetto di ricerche sull'AIDS. Il bando era stato pubblicato sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* nel luglio 1994 (Vol. 7, Suppl.) e risultava articolato nei seguenti sottoprogetti: 1) Aspetti organizzativi dell'assistenza; 2) Diagnostica dell'infezione da HIV e virus correlati; 3) Epidemiologia dell'infezione da HIV e virus correlati; 4) Eziopatogenesi dell'infezione da HIV e virus correlati; 5) Infezioni opportunistiche e neoplasie associate, aspetti neurologici e psichiatrici-psicologici dell'infezione da HIV-AIDS.

La valutazione delle proposte di ricerca è stata effettuata da apposita Commissione che si è avvalsa della collaborazione di referee nazionali e internazionali, esterni alla Commissione stessa, che hanno espresso il loro parere in completo anonimato. Su un totale di 455 proposte di ricerca presentate ne sono state approvate e finanziate 246, ripartite nei vari sottoprogetti secondo la Tabella 5.

Per la selezione delle proposte da finanziare la Commissione si è basata, oltre che sul giudizio espresso dai referee, sulle caratteristiche di originalità, rispondenza agli obiettivi specifici dei sottoprogetti, grado di fattibilità nei tempi previsti della proposta e validità scientifica del gruppo proponente.

Come per i precedenti progetti di ricerca AIDS, i risultati delle ricerche sono stati presentati e valutati durante un convegno scientifico tenutosi presso l'ISS dal 29 maggio al 2 giugno 1995. Durante tale convegno tutti i responsabili dei progetti finanziati hanno esposto, o in forma orale o per mezzo di poster, l'attività svolta. Questo metodo di rendicontazione scientifica ha avuto il merito di aggregare e coinvolgere in maniera non "formale" i ricercatori partecipanti, favorendo una discussione aperta e il con-

Tabella 5. - Proposte pervenute e finanziate per sottoprogetto nel 1995

Sottoprogetto	Proposte pervenute	Proposte finanziate	Finanziamento assegnato (ML)
1 Aspetti organizzativi dell'assistenza	29	10	808
2 Diagnostica dell'infezione da HIV e virus correlati	31	12	1309
3 Epidemiologia dell'infezione da HIV e virus correlati	65	35	3400
4 Eziopatogenesi dell'infezione da HIV e virus correlati	221	142	18569
5 Infezioni opportunistiche e neoplasie associate, aspetti neurologici e psichiatrici-psicologici dell'infezione da HIV-AIDS	109	47	4308
Totale	455	246	28394

fronto fra gruppi. Gli abstract di tali relazioni sono stati oggetto di un rapporto.

IX progetto 1996. - Nel corso del 1996 è stato attivato il IX progetto di ricerche AIDS, il cui relativo bando per la presentazione delle proposte di ricerca era stato emanato nel novembre 1995. Il IX progetto, come i bandi precedenti, ha previsto l'articolazione in sottoprogetti, in particolare: 1) Epidemiologia dell'infezione da HIV e virus correlati; 2) Marcatori prognostici e di progressione dell'infezione da HIV e virus correlati; 3) Eziopatogenesi dell'infezione da HIV e virus correlati; 4) Infezioni opportunistiche e neoplasie associate, aspetti neurologici dell'infezione da HIV/AIDS.

Le procedure adottate per la valutazione delle proposte di ricerca hanno ricalcato quelle collaudate per i bandi precedenti. Su un totale di 383 proposte di ricerca presentate, sono state approvate e finanziate 224 unità operative, ripartite nei vari sottoprogetti secondo la Tabella 6.

Il convegno di rendicontazione scientifica si è tenuto presso l'ISS dal 13 al 17 gennaio 1997. Gli abstract delle relazioni presentate dai singoli responsabili scientifici sono stati pubblicati in un rapporto.

Risultati più significativi ottenuti. - Fra i risultati più significativi ottenuti si possono citare:

- Nel campo dell'epidemiologia: studi sulla storia naturale dell'infezione da HIV e del tempo di incubazione e sopravvivenza, importanti per stimare le dimensioni dell'epidemia da HIV; studi sull'evoluzione dell'infezione perinatale da HIV e sulla diminuzione del tasso di trasmissione a seguito del trattamento delle gravide sieropositive con AZT; studi sulla trasmissione eterosessuale dell'infezione da HIV attraverso la quale la partner femminile risulta più suscettibile del partner maschile; studi sull'esposizione occupazionale all'infezione da HIV negli ospedali italiani e sui costi risultanti nell'applicazione di differenti protocolli di follow-up dell'operatore dopo l'incidente.

Tabella 6. - Proposte pervenute e finanziate per sottoprogetto nel 1996

Sottoprogetto	Proposte pervenute	Proposte finanziate	Finanziamento assegnato (ML)
1 Epidemiologia dell'infezione da HIV e virus correlati	54	28	2920
2 Marcatori prognostici e di progressione dell'infezione da HIV e virus correlati	35	17	2470
3 Eziopatogenesi dell'infezione da HIV e virus correlati	190	35	17120
4 Infezioni opportunistiche e neoplasie associate, aspetti neurologici e psichiatrici-psicologici dell'infezione da HIV-AIDS	104	50	4970
Totale	383	224	27480

- Nel campo degli studi sui marcatori prognostici e di progressione dell'infezione da HIV: studi su diverse coorti di soggetti infetti ma con lenta progressione (più di 7 anni) verso la malattia conclamata con la valutazione di diversi parametri immunologici e virologici (numero di CD4, livello della viremia, modalità di trascrizione del provirus nei linfociti infetti) che risultano diversificare questo gruppo di pazienti da quelli in rapida progressione verso la malattia; studi sulle varianti virali isolate da bambini infetti nati da madri sieropositive e che evolvono in pochi mesi in AIDS rispetto a bambini con più lenta progressione della malattia.

- Nel campo dell'eziopatogenesi dell'infezione da HIV: studi su diversi target cellulari dell'infezione da HIV, in particolare monociti-macrofagi, progenitori ematopoietici, cellule dendritiche e cellule del sistema nervoso; studi sulle variazioni genotipiche e fenotipiche dell'infezione da HIV in rapporto ai diversi stadi dell'infezione; studi su modelli animali di piccola taglia per la valutazione dei meccanismi patogenetici di infezione, per approcci vaccinali o per saggiare nuove terapie antivirali; studi su

differenti approcci di terapia genica anti-HIV e sulla valutazione della loro efficacia in modelli *in vitro*; studi per l'identificazione di nuove molecole con attività antivirale e la valutazione della loro efficacia in modelli *in vitro*; studi sulla risposta immune in corso di infezione da HIV e delle correlazioni con l'evoluzione del processo infettivo; studi sul ruolo di fattori cellulari (citochine, chemiochine) nel regolare la replicazione virale; studi sul possibile ruolo di recettori per l'HIV nel determinare la resistenza o la suscettibilità all'infezione da HIV; studi sul ruolo di proteine regolatorie del virus (*tat*, *nef*, *vpr*) nel modulare la replicazione virale; studi su virus correlati (herpes e HTLV) e sulle interazioni con l'infezione da HIV.

- Nel campo dei tumori associati all'AIDS: studi sulla eziopatogenesi del sarcoma di Kaposi e sul possibile ruolo eziologico dell'herpes virus 8 di recente identificazione; studi per la valutazione di approcci terapeutici per il trattamento delle neoplasie associate all'infezione da HIV.

- Nel campo delle infezioni opportunistiche: studi per il miglioramento delle tec-

niche diagnostiche precoci di diversi opportunisti (citomegalovirus, *Pneumocystis carinii*, tubercolosi, criptococco, criptosporidiosi); studi sui fattori di virulenza della *Candida albicans*.

- Nel campo degli aspetti neurologici e psichiatrici dell'infezione da HIV/AIDS: studi per la diagnosi non invasiva precoce delle lesioni cerebrali; studi per la valutazione dei test per la classificazione dell'AIDS dementia e per la valutazione di marcatori virologici e genetici nei pazienti con AIDS dementia; studi su possibili effetti neurocognitivi a seguito di trattamento antiretrovirale.

Programma nazionale di ricerca sull'AIDS 1997. - Nel corso del 1997 si è ritenuto necessario, anche alla luce delle più recenti conoscenze, procedere ad una ridefinizione più accurata delle aree prioritarie di ricerca, soprattutto valutandone la possibilità di ottenere risultati direttamente o indirettamente applicativi a livello di sanità pubblica. Ciò ha comportato alcune modifiche sulla strutturazione dei progetti di ricerca e, in particolare, la suddivisione dei finanziamenti dei progetti di ricerca fra "fondi intramurali" e "fondi extramurali".

Le attività di ricerca sull'AIDS, sia extra che intramurali, sono state articolate in quattro grandi aree tematiche che si configurano come altrettanti progetti: 1) Epidemiologia e modelli assistenziali; 2) Patologia, clinica e terapia dell'AIDS; 3) Patogenesi ed immunità mirate all'individuazione di nuovi bersagli chemioterapici e di prevenzione vaccinale; 4) Infezioni opportunistiche e tubercolosi derivanti dall'AIDS.

I progetti extramurali, ai quali è stato assegnato un finanziamento *ad hoc*, sono stati coordinati da un responsabile scientifico (un dirigente di ricerca dell'ISS) e per ciascuno di essi è stato costituito un Comitato scientifico indipendente.

Il bando relativo alle ricerche extramurali è stato pubblicato sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* nell'aprile 1997 (Vol. 10, n. 4, Suppl. 1) con un finanziamento complessivo previsto di 21 250 miliardi di lire.

I quattro Comitati, tutti presieduti dal Direttore dell'Istituto, si sono riuniti fra settembre e ottobre 1997 e hanno formulato, basandosi sul parere espresso dai referee e sulla propria valutazione, la ripartizione dei finanziamenti mostrata in Tabella 7.

Tabella 7. - Proposte pervenute e finanziate per progetto nel 1997

Progetto	Proposte pervenute	Proposte finanziate	Finanziamento assegnato (ML)
1 Epidemiologia e modelli assistenziali	57	21	1728
2 Patologia, clinica e terapia dell'AIDS	135	75	4800
3 Patogenesi ed immunità mirate all'individuazione di nuovi bersagli chemioterapici e di prevenzione vaccinale	149	106	10000
4 Infezioni opportunistiche e tubercolosi derivanti dall'AIDS	58	36	4022
Totale	399	238	20550

L'attività di ricerca intramurale è stata attivata per il 1997 con il metodo dell'azione concertata, una per ognuna delle 4 aree tematiche nelle quali sono stati articolati i progetti di ricerca extra-

murali. In esse sono confluite le attività di ricerca intramurali relative a due progetti ad azione concertata (1991-1996), soppressi nel 1997: "Terapia antivirale" e "Al-

lestimento e sviluppo di modelli animali finalizzato alla ricerca sul vaccino per l'AIDS".

Per il 1997 le proposte di ricerca intramurali sono state valutate, avvalendosi anche di referee esterni, da un Comitato di coordinamento interno all'ISS. La ripartizione dei finanziamenti per le 4 azioni concertate è riportata in Tabella 8.

Tabella 8. - Proposte di ricerca intramurali finanziate per progetto nel 1997

Progetto	Proposte finanziate	Finanziamento assegnato (ML)
1 Epidemiologia e modelli assistenziali	5	600
2 Patologia, clinica e terapia dell'AIDS	8	2400
3 Patogenesi ed immunità mirate all'individuazione di nuovi bersagli chemioterapici e di prevenzione vaccinale	13	4100
4 Infezioni opportunistiche e tubercolosi derivanti dall'AIDS	6	880
Totale	32	7980

2.1.4 Progetto "AIDS sociale"
(aspetti etici, psico-sociali, giuridici,
comportamentali, assistenziali
e della prevenzione nel campo dell'AIDS)

La necessità di prevedere finanziamenti *ad hoc* per attività di intervento e ricerca su problematiche di carattere sociale era scaturita nel corso degli anni durante la valutazione da parte dei Comitati scientifici dei progetti di ricerca biomedica sull'AIDS.

Veniva infatti evidenziato come si dovessero recepire le istanze non solo di ordine clinico-scientifico, ma anche di carattere sociale e particolarmente preventivo, nella consapevolezza che il problema AIDS richiedesse studi e ricerche nei suoi complessi aspetti, che ne fanno non soltanto un problema di sanità pubblica, ma anche una situazione che investe l'intera società.

Si era quindi ritenuto che la ricerca, la sperimentazione e gli interventi relativi agli aspetti etici, psico-sociali, giuridici, comportamentali, assistenziali e della prevenzione necessitassero di un apposito progetto. E' stato necessario prevedere la possibilità di una larga partecipazione delle organizzazioni non governative. Queste, infatti, sia per le loro caratteristiche che per le modalità con cui si trovano ad operare, possono raggiungere obiettivi che non sono facilmente realizzabili da parte delle istituzioni pubbliche.

Attività svolta

I progetto "AIDS sociale" 1994-1995. - Bandito nell'ottobre 1993, ha avuto la definitiva approvazione e assegnazione dei finanziamenti solo nel gennaio 1995.

Data la peculiarità delle proposte presentate, il Ministro della Sanità pro-tempore aveva ritenuto opportuno avvalersi di una ulteriore valutazione delle proposte di fi-

nanziamento formulate da un primo Comitato scientifico. La valutazione delle proposte da parte di un secondo Gruppo di lavoro ha comportato l'allungamento dell'iter di valutazione e lo slittamento dell'inizio delle attività al 1995.

Lo stato di avanzamento del programma e i risultati in corso sono stati discussi, in analogia con quanto si era verificato per il programma di ricerca scientifico, nel corso di un "Progress report meeting", tenutosi presso l'ISS il 18 e 19 ottobre 1995. Come per i progetti di ricerca biomedica, gli abstract dei risultati inviati dai gruppi partecipanti sono stati pubblicati a cura dell'ISS in una monografia specifica.

Il progetto "AIDS sociale" 1996-1997. - Nel corso del 1996 è stato attivato il II progetto "AIDS sociale", il cui relativo bando per la presentazione delle proposte era stato emanato nell'agosto 1995. Il II progetto, come il bando precedente, è stato articolato in due sezioni distinte, di cui la prima costituita da vere e proprie attività di ricerca nel campo degli aspetti etici, psico-sociali, giuridici, comportamentali, assistenziali e della prevenzione nel campo dell'AIDS; la seconda costituita da sperimentazioni e interventi che dovevano avere finalità di raggiungere risultati direttamente trasferibili alle realtà del paese o di migliorare il livello assistenziale per i soggetti con infezione da HIV e la loro qualità di vita.

Ambedue le sezioni sono state articolate in sottoprogetti, in particolare: 1) Prevenzione; 2) Aspetti etici, giuridici e medico-legali dell'assistenza agli infetti da HIV; 3) Prevenzione su soggetti a rischio di infezione da HIV o su soggetti a rischio non infetti; 4) Prevenzione su soggetti già infettati; 5) Problematiche assistenziali.

Il progetto ha avuto un Comitato di valutazione diverso da quello del progetto scientifico. Tale comitato è stato nominato dal Ministro della Sanità pro-tempore, presieduto dal Direttore dell'ISS e composto da rappresentanti di organi istituzionali (ISS, Ministero della Sanità, università, regioni).

La parte del progetto relativa alla ricerca è stata valutata secondo i criteri della ricerca scientifica già ampiamente utilizzati nelle annualità precedenti del "Progetto di ricerca scientifica AIDS", che hanno quindi previsto l'acquisizione di pareri da parte di referee italiani, esperti della stessa area in cui venivano proposti i progetti.

La parte del progetto relativa alle sperimentazioni e agli interventi è stata valutata in base all'appropriatezza del programma, alla congruenza rispetto ai programmi nazionali, alla fattibilità, alla capacità di raggiungere la popolazione bersaglio dell'intervento, alla disponibilità, da parte del proponente, delle strutture e delle attrezzature necessarie, alla congruenza della proposta con i programmi regionali nello specifico settore, alla loro congruenza metodologica e alla possibilità di fornire risultati valutabili in modo rigoroso.

Il processo di valutazione dei progetti si è basato sul giudizio per ogni singolo progetto di: 1) qualità e originalità; 2) qualificazione del proponente; 3) fattibilità dell'attività proposta; 4) capacità dell'ente e dell'organizzazione non governativa di svolgere l'attività proposta; 5) congruità dei finanziamenti richiesti.

Su un totale di 217 proposte pervenute, sono state approvate e finanziate 80 proposte (di cui 37 presentate da organizzazioni non governative) per un finanziamento totale di 4157 miliardi. L'articolazione delle unità operative finanziate è stata la seguente: 41 unità per la sezione ricerca (di cui: 9

nel sottoprogetto 1; 4 nel sottoprogetto 2; 7 nel sottoprogetto 3; 4 nel sottoprogetto 4; 17 nel sottoprogetto 5); 39 unità per la sezione di sperimentazione e intervento (di cui: 10 nel sottoprogetto 1; 2 nel sottoprogetto 2; 14 nel sottoprogetto 3; 1 nel sottoprogetto 4; 12 nel sottoprogetto 5). La ripartizione fra proposte presentate da enti pubblici e organizzazioni non governative è riportata in Tabella 9.

Considerazioni finali

Il progetto "AIDS sociale", che si configura come programma di intervento e ricerca, è stato affidato all'Istituto Superiore di Sanità e gestito con modalità analoghe a quelle dei progetti di ricerca scientifica sull'AIDS. L'uso di revisori anonimi e l'adozione di criteri rigidamente scientifici nel caso di un progetto indirizzato in gran parte al finanziamento di programmi di intervento gestiti da organizzazioni non governative ha però comportato dei problemi. Infatti, alcune organizzazioni hanno ritenuto che il loro progetto dovesse servire a finanziare il loro stesso funzionamento e hanno espresso dubbi nell'accettare le priorità decise in base alle modalità di valutazione di cui sopra.

Inoltre, la carenza di esperti nel settore nell'Istituto stesso ha limitato la capacità di gestione di un progetto che in parte nasceva con premesse quantomeno ambigue. E' per questo motivo che, se da un lato si può ritenere positivo lo sforzo effettuato per finanziare interventi sociali a buon livello nel campo dell'AIDS nel nostro paese, dall'altro si intravede l'esigenza di trovare modalità alternative di allocazione delle risorse alle organizzazioni non governative che svolgono un'attività di intervento ritenuta valida. Probabilmente, si potrebbe configurare la possibilità di finanziamento

diretto di organizzazioni che abbiano una - interesse locale, una migliore gestione, per rete nazionale da parte dello stesso Ministero della Sanità. L'erogazione di fondi da parte delle regioni garantirebbe, per quanto attiene a quelle iniziative che avessero un - mettendo di valutare l'articolazione degli interventi del pubblico e del privato sociale in base alle necessità del territorio, e ne favorirebbe l'integrazione.

Tabella 9. - Proposte presentate da enti pubblici e da organizzazioni non governative, suddivise per sottoprogetto

Sottoprogetto	Provenienza*	Proposte		Finanziamento assegnato (ML)
		pervenute	finanziate	
1 La prevenzione	EP	34	11	470
	ONG	19	8	672
2 Aspetti etici, giuridici, e medico-legali dell'assistenza agli infetti da HIV	EP	9	3	145
	ONG	7	3	170
3 Prevenzione su soggetti a rischio di infezione da HIV o su soggetti a rischio non infetti	EP	25	8	400
	ONG	40	13	670
4 Prevenzione su soggetti già infetti	EP	4	3	120
	ONG	10	2	80
5 Problematiche assistenziali	EP	39	18	850
	ONG	30	11	580
Totale		217	80	4157

* EP = enti pubblici; ONG = organizzazioni non governative

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

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

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

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

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

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

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

Attività svolta

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obiettivi

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

Attività svolta e risultati più significativi ottenuti

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

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

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

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

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

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

Sono stati sperimentati i seguenti tipi di vaccino:

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