

SINTESI DEI RISULTATI OTTENUTI DELLE RICERCHE SANITARIE FINALIZZATE FINANZIATE NEGLI ANNI 1999 – 2000

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 880/02/99

Responsabile Scientifico Altavilla Giuseppe - Ente Proponente Università di Padova

“Regolatori del ciclo cellulare e loro alterazioni nelle neoplasie del sistema nervoso centrale”.

Le neoplasie del Sistema Nervoso Centrale (SNC) sono neoplasie poco frequenti con una tendenza all'incremento e con un'alta incidenza di mortalità. I criteri di malignità e la valutazione prognostica sono attualmente basate sulla valutazione dei caratteri chimici: sede, dimensioni, età, e sulla tipizzazione morfologica. Esiste una buona documentazione che correla la morfologia con la natura biologica delle neoplasie, con l'aggressività e quindi con la prognosi.

Il Ciclo Proliferativo

Le cellule neoplastiche, e le non neoplastiche, presentano una progressione per fasi durante il ciclo proliferativo, sequenziali tra loro; solo al completamento della prima può seguire la seconda e quindi la successiva. G0 è detta la fase di intercinesi e G1 è la prima fase che innesca il ciclo replicativo durante la quale la cellula si prepara per la replicazione. S è la fase successiva durante la quale avviene duplicazione del DNA; G2 è la fase seguente che prepara alla vera e propria divisione cellulare ed infine la fase M della Mitosi. Questo schema sembra essere comune sia alle cellule normali che alle cellule neoplastiche, con tuttavia differenze sostanziali tra le due condizioni; le differenze consistono nella diversa capacità di controllo e di regolazione dell'avanzamento. Il controllo e la regolazione delle fasi del ciclo cellulare nelle cellule normali è molto rigido, permettendo la costituzione di Sistemi cellulari (tessuti, organi) relativamente stabili e/o costanti. I sistemi cellulari neoplastici presentano numerose alterazioni dei sistemi regolativi del ciclo cellulare connesse con lo stato biologico neoplastico, e risultano sempre provvisti di un variabile grado di indipendenza dagli stimoli esterni. Da qui la necessità di conoscere i normali meccanismi di regolazione e le loro alterazioni.

Il ciclo cellulare ha diversi "Punti critici" (Checkpoints) che sono sotto il controllo di un complesso sistema di modulatori tra cui i più studiati sono: pRB - prodotto del Gene del Retinoblastoma; le Cicline; le Kinasi Ciclina-dipendenti (CDKs) e gli inibitori delle kinasi Ciclina-dipendenti (CDKIs). La sequenza più studiata è il passaggio G1-S con l'inattivazione del pRB, che normalmente blocca la progressione in S. Questa inattivazione può avvenire con meccanismi diversi il più comune è la Fosforilazione del pRB, attuata dal complesso enzimatico: Ciclina-CDK. L'inattivazione tramite fosforilazione del pRB comporta la progressione in fase S. Il complesso enzimatico Ciclina-CDK a sua volta è regolato da inibitori CDKIs che sono in grado di modulare la sua capacità fosforilante e quindi il grado di inattivazione del pRB. Questi inibitori del ciclo CDKIs sono strettamente correlati con l'attività della p53, proteina chiave per la progressione del ciclo cellulare oltre la fase S e per l'insuccesso dell'Apoptosi in caso di insuccesso della progressione.

Proteina del Retinoblastoma

Il gene RB è stato il primo "tumor suppressor gene" isolato e donato e le sue alterazioni sono state documentate in numerosi tumori umani; esso può essere inattivato da Mutazioni, da inserzioni di geni virali, da delezione o anche da Fosforilazione. La valutazione dello stato di fosforilazione della proteina è stata proposta come indice prognostico in alcuni tumori valido soprattutto nei sistemi che non presentano alterazioni genetiche, indirettamente contribuisce ad una valutazione dell'efficacia del complesso Ciclina- Ciclina-CDKs.

Cicline D1 e E

Le Cicline sono proteine che regolano specifiche Kinasi del ciclo cellulare alle quali si legano direttamente; sono attivate sequenzialmente: la D1 nella fase precoce G1 e dopo la E. La modulazione dell'attività CDK e quindi la fosforilazione del pRB (che diventa inattivo) porta alla progressione del ciclo proliferativo. Le Cicline D1, E sono quelle più studiate e le cui alterazioni sono state più frequentemente documentate in numerosi tumori umani.

La Ciclina D1 è ritenuta un debole protooncogene in quanto provvista di capacità trasformante sui fibroblasti insieme all'attivazione di H-Ras. L'attivazione della Ciclina D1 fu osservata negli adenomi della paratiroide come risultato di un'inversione cromosomica (dal locus 11q13 al 11p15) e successiva traslocazione e fu denominato oncogene PRAD1. Riarrangiamento tipo PRADt documentato in alcuni linfomi: Linfomi mantellari B; tuttavia nei tumori solidi il più frequente meccanismo di alterazione della Ciclina D1 è risultata essere la sua amplificazione con conseguente "overexpression".

La Ciclina E è un regolatore della subunità CDK2 e controlla la progressione G1-S sempre modulando la fosforilazione del pRB; l'inattivazione del pRB richiede la sequenziale e complementare azione sia della ciclina D1-CDK4-6, che della ciclina E-CDK2. Ciclina E è iperespressa nel carcinoma della mammella e tale condizione sembra correlata con la negatività per i recettori per gli estrogeni. CDKIs

Sono proteine a basso peso che per la loro capacità di inibire la progressione del ciclo proliferativo cellulare sono considerate prodotti dei potenziali "suppressor genes". Queste proteine appartengono a due famiglie distinte in base alle loro caratteristiche strutturali e funzionali: le INK4 che comprendono la p 16/INK4A (p16), p15/INK4B (p15), p 18/INK4C (p18), p19/INK4D (p19). Queste formano complessi con le CDK4 e/o CDK6 e con le Cicline di tipo D; la loro attività funzionale è dipendente dalla presenza della normale proteina del Retinoblastoma (Rb). La massima espressione di INK4 avviene durante la fase centrale della fase S.

Il secondo gruppo di inibitori delle CDK sono le proteine: Cip/Kip che comprendono: p21 WAF1/CIP1 (p21), p27/kipl (p27), p57/kip2 (p57) (14,22). Queste inibiscono l'attività kinasica dei complessi G1 Ciclina E-CDK2, Ciclina D-CDK4/6 e di altre cicline. Le Cip/kip proteine sono anche dette CDKI universali perché sono capaci di interagire con diversi complessi CDK, con le Cicline A, E, D1, D2 e D3 e CDKs. Over- expression delle Kip proteine porta ad un arresto del ciclo cellulare; esse hanno tra loro una notevole omologia superiore in media al 40% di amino-acidi. Hanno tutte una localizzazione nucleare e possono inibire oltre al complesso CDK4/6 anche il CDK2. La p16 ha mostrato frequenti alterazioni in linee cellulari di tumori umani e l'alterazione ritenuta più frequente nelle neoplasie è ritenuta la sua mancanza o ridotta concentrazione; relativamente alla bassa espressione la ipermetilazione del gene codificante sembra implicato come meccanismo possibile in alcuni carcinomi mammari e tumori endocrini.

La p21 è una CDKI a largo spettro di substrati CDK ed è ritenuta responsabile del meccanismo di arresto del ciclo cellulare a seguito di processi riparativi del DNA. In questo senso la p21 è responsiva alla p53 wild type ma non alla forma mutata. Le mutazioni della p21 sono rare più frequente l'iperespressione che tuttavia è indipendente da espressione di p53. La p27 è una delle più tardive CDKI e sembra essere importante come marker predittivo dell'evoluzione di numerosi tumori. Essa effettivamente induce arresto del ciclo proliferativo e diminuisce l'attività ciclina-CDK di linee cellulari di tumore mammario, inoltre agisce come potenziale genotumor suppressor, come promotore della apoptosis, come regolatore della resistenza ai farmaci e anche come regolatore della differenziazione delle cellule muscolari, degli oligodendrociti, osteoblasti e della cellula delle granulose. In particolare è stato osservato come la p27 si accumula e raggiunge alti livelli negli oligodendrociti maturi fatto che lega direttamente la differenziazione di queste cellule con la possibilità di avere alte concentrazioni di p27.

Relazione tra i regolatori del Ciclo Cellulare

La regolazione dei meccanismi di progressione del ciclo non è semplice, inoltre sempre nuovi modulatori sono individuati e questo contribuisce a rendere ancora più complesso il sistema e lo studio dello stesso che deve tener conto delle possibili interrelazioni tra tutte queste sostanze. Tale complessità permane anche nei sistemi tumorali, anzi si assiste ad una progressiva disattivazione o meglio smantellamento e semplificazione o by-pass dei checkpoint regolativi. Questa progressività probabilmente è uno dei marcatori più fedeli delle alterazioni genetiche correlate alla progressione: Lesioni preneoplastiche - Neoplasie e Tumori benigni -Tumori maligni. In questa prospettiva la valutazione di alcuni marcatori di questa complessità regolativa potrebbe costituire una adeguata valutazione prognostica e di indirizzo terapeutico.

Presso l'Istituto di Anatomia Patologica di Padova esiste una raccolta di centinaia di preparati istologici e di relativi inclusi in paraffina di neoplasie del SNC; obiettivo primario della presente ricerca è stato quello di: 1) riclassificare morfologicamente alla luce dei nuovi parametri individuati e delle più recenti acquisizioni queste neoplasie utilizzando quando necessario le metodologie della tipizzazione immunoistochimica e della microscopia elettronica a trasmissione. 2) Acquisire parametri prognostici attraverso lo studio dei regolatori del ciclo di proliferazione cellulare: pRB, Cicline D1, E, CDKs e CDKIs (in particolare p16 e p27). 3) Valutazione dei dati con le strategie terapeutiche adottate e con i risultati clinici ottenuti (persistenza di malattia, mortalità). In questa prima fase è stato effettuato un primo screening e sono stati individuati, come oggetto di approfondimento 29 Emangioblastomi, tutti sporadici e localizzati nel cervelletto. Le neoplasie sono state riclassificate valutandone le caratteristiche morfologiche: dimensioni, localizzazioni, composizione e tipo di cellule ultrastrutturali, che hanno consentito di definirne con maggiore certezza la diagnosi. Sono state inoltre indagate utilizzando metodiche immunoistochimiche i seguenti marcatori immunofenotipici e di correlazione istogenetica : EMA, Cam. 5.2, NSE, Ag-FVII, 8-100, GFAP, Cromogranina, Neurofilamenti, HHF35, Ulex-Eu, Vimentina, CD 31, CD34, HMB-45, Mac 387, CD 68, CD la. L'attività proliferativa delle neoplasie è stata valutata con l'analisi semiquantitativa dell'Indice mitotico e dell'Ag Ki 67 (MIB-1).

La netta prevalenza nella popolazione neoplastica di cellule "chiare" e la sola debole e variabile positività per l'S-100 non hanno chiarito la istogenesi di questi tumori che talora possono far parte della più complessa sindrome familiare di Von Hippel-Lindau. La costante presenza di un fronte di compenetrazione tra le cellule neoplastiche e il tessuto nervoso adiacente sottolinea la tendenza alla locale aggressività della neoplasia, sebbene altrettanto costante è stato il riscontro di un basso indice mitotico e di cellule in ciclo proliferativo. In alcuni casi è stato effettuato anche l'esame ultrastrutturale che ha confermato le caratteristiche morfologiche delle cellule chiare principali. Sono stati rivalutati 452 Meningiomi raccolti dal 1988 al 1995 e sono stati riaggregati in funzione della

valutazione dei parametri morfologici e dei parametri proliferativi quantificati. Questo studio comparativo ha consentito di confermare la validità della classificazione in tre categorie a prognosi diversa: Meningiomi benigni, Atipici. I risultati ottenuti dalla nostra ricerca sono stati: Meningiomi Benigni 78,98%; Meningiomi Atipici 16,59%; Meningiomi Maligni 4,43%. I meningiomi atipici e maligni hanno mostrato un incremento dell'espressione della p53 ed una riduzione o assenza di p21 e di p27. Tale riduzione si correlava anche con la attività proliferativa valutata come indice di Mib-1.

Sono stati studiati i Linfomi Primitivi del Sistema nervoso Centrale in soggetti non affetti da Immunodeficienze e pertanto ritenuti "primitivi"; sono stati selezionati 30 casi corrispondenti ai rigidi criteri della primitività. Sono stati riclassificati alla luce delle più attuali classificazioni dei linfomi linfonodali e sulla base dei criteri di caratterizzazione immunofetipica della popolazione neoplastica. Le classificazioni adottate sono state quella di Kiel e di REAL ed è stato utilizzato un panel di anticorpi (24 anticorpi) molti dei quali monoclonali. I risultati ottenuti hanno chiarito che la stragrande maggioranza di questi linfomi sono di Tipo B; che sono per lo più ad alto grado di malignità e più frequenti nell'encefalo rispetto alla localizzazione midollare. Inoltre le classificazioni dei linfomi linfonodali non combaciano perfettamente in quanto i linfomi cerebrali sono più eterogenei rispetto agli analoghi linfonodali.

Sono stati riesaminati 51 Oligodendrogliomi cerebrali documentati dal 1980 al 1996; lo studio è stato condotto secondo 3 direttive: A) rivalutazione grading; B) valutazione del compartimento proliferativo, tramite quantificazione dei parametri immunoistochimici; C) valutazione del DNA Index, fase S e Ploidia tramite citofluorimetria secondo il metodo di Hedley. Gli oligodendrogliomi maligni hanno mostrato una scarsa reattività alla p53, mentre la positività alla p27 è stata inversamente correlata con il grading.

Utilizzando inoltre un sistema sperimentale è stata studiata la resistenza della barriera ematoencefalica e le modalità di sviluppo della risposta immunitaria intracerebrale alla infezione di HSV-1. Questo è stato fatto valutando in topini inoculati con il virus il grado e la sede della risposta immunitaria e la natura delle lesioni necrotico-infiammatorie. I risultati ottenuti confermano 1) la specificità del neurotropismo virale, e 2) la presenza di un infiltrato flogistico costituito da macrofagi (CD 68+) e di linfociti T (CD 3+ e CD43+) intorno ai vasi dai quali sembra partire la risposta immunitaria.

La presente proposta di ricerca viene indirizzata sullo studio dei meccanismi e delle sostanze in grado di esercitare una regolazione del ciclo proliferativo cellulare ed è incentrata sulla valutazione delle possibili alterazioni di questi nelle diverse neoplasie del SNC, focalizzando l'indagine soprattutto su quelle forme in cui la ricaduta in termini di decisione di trattamento può essere importante.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 882/04/99

Responsabile Scientifico Angeli Paolo - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Terapia genica del danno epatico cronico da tetracloruro di carbonio: effetti del trasferimento del gene dell'isoforma costitutiva dell'ossido nitrico sintetasi (eNOS) sulle alterazioni della matrice extracellulare e sulle conseguenti alterazioni dell'emodinamica splancnica”.

Valutazione dei livelli basali di attività intraepatica della Akt e della eNOS.

La valutazione della Akt fosforilata negli omogenati di fegato ha evidenziato una sua ridotta disponibilità nei ratti cirrotici rispetto ai ratti controllo. In accordo con questa osservazione, anche la disponibilità di eNOS fosforilata in corrispondenza della serina 1177, per un processo catalizzato dalla Akt, è risultata ridotta nei ratti cirrotici. Non sono state osservate, invece, differenze significative nell'espressione proteica della Akt e della eNOS tra i due gruppi di animali. Nel loro complesso, queste osservazioni suggeriscono che la ridotta attività della eNOS a livello intraepatico è il risultato di una ridotta attività della Akt.

Trasferimento genico in vitro.

Lo studio della transfezione delle cellule endoteliali bovine con gli adenovirus ha evidenziato che tali cellule hanno espresso in pari misura l' AA-Akt e il myr-Akt. Le cellule endoteliali con espressione del myr-Akt rispetto a quelle con espressione dell'AA-Akt hanno presentato una maggior espressione della eNos fosforilata. Le cellule endoteliali con espressione della myr Akt hanno inoltre presentato una maggiore produzione di NO rispetto sia a quelle con espressione della AA-Akt sia a quelle con espressione della β -gal.

Trasferimento genico in vivo.

Lo studio della distribuzione tissutale della transfezione della β -gal con adenovirus nei ratti controllo si è basato sulla valutazione dell'espressione e dell'attività della β -gal nel fegato, nell'aorta, nel mesentere, nel polmone e nel cuore dei ratti controllo tre giorni l'iniezione degli adenovirus nella vena della coda. In accordo con studi precedenti

i più alti livelli di espressione e di attività della β -gal sono stati riscontrati a livello intraepatico. L'attività intraepatica della β -gal è stata ancora documentata, anche se in forma ridotta, 15 giorni dopo la trasfezione. Non è stata invece più riscontrata quando valutata a 30 giorni dalla stessa. Per ciò che concerne gli effetti della trasfezione con adenovirus a livello intraepatico è stata osservata un'aumentata espressione della myr-Akt prevalentemente a livello epatocitario ma anche a livello endoteliale. A ciò è corrisposto un incremento della espressione della eNOS fosforilata in tali elementi cellulari con conseguente aumento della loro produzione di NO. Ciò è stato dimostrato attraverso il riscontro di un incremento della produzione di guanosina 3'-5' monofosfato (cGMP), il mediatore biologico dell'NO a livello intraepatico (Fig.1: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Valutazione degli effetti del trasferimento genico in vivo sui parametri dell'emodinamica splancnica e sistemica.

La trasduzione della myr-Akt nel fegato dei ratti cirrotici ha determinato una riduzione di circa il 40 % della pressione portale (Fig.2: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) ed un significativo incremento della pressione arteriosa media (Fig. 3 : agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). Non sono state invece osservate variazioni significative della portata cardiaca (Fig. 4: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Per contro la transinfezione con β -gal adenovirus non ha modificato alcuno tra i parametri sopra indicati.

La valutazione del flusso ematico nell'arteria mesenterica superiore dei ratti cirrotici sottoposti a transinfezione con adenovirus ha permesso di evidenziare un flusso ridotto negli animali transinfettati con myr-Akt adenovirus rispetto a quelli transinfettati con β -gal adenovirus (21.33 ± 0.74 ml/min versus 26.29 ml/min, $p \leq 0.01$).

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 883/01/99

Responsabile Scientifico Angelini Annalisa - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Studio patologico della morbilità e mortalità precoce e a distanza del cardiopatico congenito operato. Istituzione di un registro autoptico”.

L'obiettivo della nostra ricerca prevedeva la costituzione di un Registro autoptico e bioptico dei cuori con cardiopatie congenite operate, sia da autopsia che da trapianto per cardiopatie congenite e di un registro delle biopsie polmonari di cardiopatici congeniti per la definizione del grading della vasculopatia polmonare ipertensiva. La finalità era quella di definire le cause di mortalità e morbilità precoce e a distanza nel cardiopatico congenito operato con verifica degli approcci chirurgici; le cause di disfunzione ventricolare e morte improvvisa, due delle principali cause di mortalità a distanza; ottimizzare i risultati operatori, ideare nuove tecniche o varianti chirurgiche.

Attraverso la revisione dei cuori conservati nel museo dell'istituto di anatomia patologica e delle biopsie polmonari conservate nell'archivio istopatologico durante il nostro studio si è giunti alla costituzione di un registro autoptico e bioptico del cardiopatico congenito operato con archiviazione in sacchetti di plastica sigillati dei cuori in apposite scaffalature catalogati per grandi gruppi di patologie native per facilitare la consultazione degli esemplari con malformazioni identiche ma con differenti anomalie associate e di un archivio immagini catalogate per numero e per tipo di patologia sempre per un facile utilizzo didattico. Sono state archiviate in modo digitalizzato circa 2000 immagini. Durante l'archiviazione è stato possibile rivedere i preparati e definire le cause di morte raggruppandole in quattro gruppi che rappresentano le cause di insuccesso chirurgico: diagnosi inaccurata ed indicazione chirurgica tardiva, deficienza chirurgica, complicanze post-operatorie e morti inspiegate. Per alcune patologie di più frequente riscontro si è cercato anche di valutare tali cause in base ad un criterio temporale: intraoperatorio (entro 24h dall'intervento chirurgico), precoce (entro 30 giorni dall'intervento) e a distanza (oltre i 30 giorni), e successivamente in base ad una suddivisione di ordine cronologico in due periodi, dal 1969 al 1991 e dal 1992 al 2002. Due grandi gruppi sono stati analizzati in modo dettagliato a scopo esemplificativo: la patologia tronco-conale ed il cuore sinistro ipoplasico.

Tra le malformazioni tronco-conali abbiamo raggruppato: la Tetralogia di Fallot isolata ed Atresia polmonare con difetto interventricolare, la Trasposizione delle Grandi Arterie a setto integro e con difetto interventricolare e il Tronco Arterioso Comune. I casi appartenenti a tale gruppo sono stati 85 pazienti con un'età, all'intervento, compresa tra 2 giorni e 46 anni, età media 3.9 ± 9 anni (mediana, 3 mesi), il 48% di sesso femminile e il 52% di sesso maschile affetti da:

- Tetralogia di Fallot e Atresia polmonare con difetto interventricolare, 42 casi (il 49% della casistica), di età compresa tra 20 giorni e 46 anni, media 7.0 ± 11.7 anni (mediana, 21 mesi)

- Trasposizioni delle Grandi Arterie, 31 casi (36% della casistica), con un'età compresa tra 2 giorni e 26 anni, età media 14±56. 3mesi (mediana, 2 mesi), sottoposti ad intervento di correzione anatomica (tipo "switch" arterioso) nel 48% dei casi totali di TGA e di correzione fisiologica (tipo Senning e Mustard) nel 52% dei casi.
- Tronco Arterioso Comune, 12 casi (14% della casistica), con un'età compresa tra 9 giorni e 4 anni, media 4.8±13.8 mesi (mediana, 17 mesi).

TETRALOGIA DI FALLOT (TOF)

I decessi intraoperatori sono stati 14 (33% dei casi totali di TOF), i precoci 21 (50%) quelli a distanza 7 (17%). Le cause che hanno determinato il decesso intraoperatorio sono state: l'ipertensione ventricolare destra per significativa stenosi residua delle arterie polmonari, 6 casi (6/14, 43%), distorsione dell'arteria conale 2 casi (14%), lesione dell'arteria coronarica anomala 1 caso (7%), danno al tessuto di conduzione 2 casi (14%), danno ischemico miocardico diffuso 1 caso (7%), vasculopatia polmonare 1 caso (7%) e in 1 caso non si è riconosciuto alcun substrato anatomico che può essere riferito al decesso. Le cause di decesso precoce sono state: la stenosi residua delle arterie polmonari 3 casi (3/21, 14%), anomalia coronarica non diagnosticata, 1 caso (5%), distorsione dell'arteria conale, 1 caso (5%), danno al tessuto di conduzione 4 casi (19%), danno ischemico miocardico, 2 casi (9%), discoagulopatia postoperatoria, 3 casi (14%) ostruzione bronchiale 2 casi (9%), danno cerebrale da embolo paradossale 1 caso (5%), cleft della valvola mitrale, 1 caso (5%), vasculopatia polmonare, 1 caso (5%) e 2 casi inspiegati. Le cause di morte nei decessi a distanza sono state: danno ischemico miocardico 2 casi (2/7 29%), sostituzione fibro-adiposa 3 casi (43%), deiscenza del patch 1 caso (14%) e infine cardiomegalia con dilatazione biventricolare 1 caso (14%).

TRASPOSIZIONE DEI GRANDI VASI (TGA)

Nel caso della TGA i decessi intraoperatori sono 14 casi (45% dei casi totali di TGA), i decessi precoci 14 casi (45%), e i decessi a distanza 3 casi (10%). Le cause di morte entro 24h sono state: danno miocardico ischemico da reimpianto di coronarie 4 casi (29% rispetto al totale dei decessi intraoperatori), danno miocardico ischemico diffuso 1 caso (7%), vasculopatia polmonare 2 casi (14%), discoagulopatia post-operatoria 1 caso (7%), ostruzione bronchiale 1 caso (7%), danno al tessuto di conduzione 1 caso (7%), deiscenza del "patch" interatriale 1 caso (7%), danno acuto della valvola mitrale 1 caso (7%), ostruzione cavale 1 caso (7%) e tromboembolia polmonare 1 caso (7%). Nei decessi precoci le cause di morte sono state: danno miocardico da reimpianto di coronarie 3 casi (21% rispetto ai casi di decesso precoce), scompenso cardiaco per crisi ipertensive polmonari refrattarie 1 caso (7%), vasculopatia polmonare 2 casi (14%), discoagulopatia post-operatoria 2 casi (14%), danno al tessuto di conduzione 1 caso (7%), ostruzione cavale 2 casi (14%), ostruzione delle vene polmonari 1 caso (7%), ipoplasia del ventricolo di sinistra 1 caso (7%) e infezione 1 caso (7%). Infine le cause di decessi a distanza sono state: vasculopatia polmonare 1 caso (33% rispetto ai casi totali a distanza), anomalia coronarica non diagnosticata 1 caso (33%) e ostruzione delle vene polmonari 1 caso (33%).

TRONCO ARTERIOSO COMUNE (TA)

I decessi intraoperatori sono 7 (58% dei casi totali di TA), i precoci 4 (33%) quelli a distanza 1 (8%). Le cause di morte nei decessi precoci sono state: condizioni emodinamiche preoperatorie scadenti 1 caso (14%), valvola truncale displasica 2 casi (29%), anomalia coronarica non diagnosticata 1 caso (14%), interruzione dell'arco aortico non diagnosticato 1 caso (14%), danno ischemico miocardico 1 caso (14%). Nei decessi precoci le cause di morte sono state: danno miocardico ischemico 1 caso (25%), scompenso cardiaco da crisi ipertensive polmonari refrattarie 2 casi (50%), discoagulopatia post-operatoria 1 caso (25%) e 1 caso in cui non si è riconosciuto alcun substrato anatomico.

Le cause di insuccesso post-operatorio si sono distribuite a seconda del periodo considerato, 1969-1991 e 1992-2002, come segue:

CAUSE DI INSUCCESSO POST-OPERATORIO (1969-1991)	TOF		TGA		TA		Totale	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Diagnosi inaccurata /Indicazione chirurgica tardiva	2	(7)	6	(24)	1	(17)	9	(15)
Inappropriatezza chirurgica	12	(43)	13	(52)	2	(33)	27	(46)
Complicanze post-operatorie	11	(39)	6	(24)	3	(50)	20	(34)
Morte inspiegata	3	(11)	-	-	-	-	3	(5)
Totale	28	(100)	25	(100)	6	(100)	59	(100)

CAUSE DI INSUCCESSO POST-OPERATORIO (1992-2002)	TOF		TGA		TA		Totale	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Diagnosi inaccurata /Indicazione chirurgica tardiva	2	(14)	-	-	2	(33)	4	(15)
Inappropriatezza chirurgica	12	(86)	4	(67)	3	(50)	19	(73)
Complicanze postoperatorie	-	-	2	(33)	-	-	2	(8)
Morte inspiegata	-	-	-	-	1	-	1	(4)
Totale	14	(100)	6	(100)	6	(100)	26	(100)

Il nostro studio ha evidenziato come le cause di insuccesso post-operatorio possano essere sempre ricondotte a tre grandi capitoli: diagnosi inaccurata con dati incompleti o parziali, o scelta del timing dell'intervento chirurgico non ottimale con dilazioni che favorivano l'insorgenza di insufficienza multiorgano o di vasculopatia polmonare ipertensiva; inappropriata tecnica chirurgica; complicanze post-operatorie come infezioni polmonari precoci e morte improvvisa a distanza.

L'analisi più dettagliata dei nostri risultati effettuata dividendo la nostra casistica cronologicamente in due periodi dal 1969 al 1991 e dal 1992 al 2002, ha evidenziato una netta riduzione delle complicanze post-operatorie, verosimilmente da attribuire ad una maggior attenzione all'assistenza in terapia intensiva a cui non è corrisposta una riduzione dei casi di decesso attribuibili a diagnosi incompleta, nonostante la maggior capacità di diagnosi strumentale. Questo paradosso può essere spiegato con il fatto che l'ecocardiografia non presenta la stessa sensibilità riguardo la definizione morfologica delle origini e del percorso delle arterie coronarie al cui stato anomalo è da riferire la maggior parte dei decessi. Per quanto riguarda i dati degli insuccessi da inappropriatezza chirurgica, l'aumento relativo nel secondo intervallo di tempo considerato è, a nostro avviso, da attribuire all'introduzione di nuove tecniche chirurgiche e all'allargamento di indicazione di casi particolarmente complessi.

Tra le malformazioni definite come cuore sinistro ipoplasico caratterizzate dalla presenza di un ventricolo sinistro ipoplasico o virtuale con atresia o ipoplasia aortica e mitralica e sottoposte ad intervento di tipo Norwood, abbiamo individuato 44 casi. Di questi 40 erano stati sottoposti ad intervento di I stadio secondo Norwood, 2 di II stadio e 2 di III stadio.

L'intervento di tipo Norwood è un intervento chirurgico in 3 stadi che consiste in: 1) primo stadio: ricostruzione di una neoarteria che viene commessa al ventricolo destro che diventa sistemico, creazione di una anastomosi sistemico-polmonare tipo Blalock e atrioseptostomia; 2) secondo stadio: confezionamento di una anastomosi cavo superiore-arteria polmonare (emi-Fontan) (demolizione dello shunt); 3) terzo stadio: completamento della Fontan con connessione della vena cava inferiore attraverso tumellizzazione intraatriale.

Abbiamo raggruppato le cause di morte in base alla stadiazione alla quale i pazienti erano stati sottoposti prima del decesso e in base all'intervallo di tempo dall'ultimo intervento in perioperatorio entro 24 ore, precoce entro i 30 giorni e tardivo oltre i 30 giorni dall'intervento: 21 casi con ostruzione dell'aorta, dei quali 14 con ostruzione dell'aorta ascendente e/o dell'arco deceduti dopo il I stadio, 11 deceduti a 24 ore e 3 a 30 giorni. 7 casi con coartazione aortica, deceduti dopo I stadio (5 oltre i 30 giorni ed 1 entro le 24 ore) e 1 caso dopo stadio II a distanza. 3 casi con distruzione delle arterie coronarie, tutti deceduti dopo I stadio e nel perioperatorio. 14 casi con trombosi o distorsione delle shunt o delle arterie polmonari deceduti dopo primo stadio (8 perioperatori, 6 precoci). 2 casi con displasia della valvola polmonare deceduti dopo stadio I (tutti perioperatori). 1 caso con restrizione del difetto interatriale, deceduto dopo I stadio in fase perioperatoria. 1 caso con disfunzione del ventricolo destro deceduto dopo stadio II, oltre i 30 giorni. 2 casi con trombosi dello shunt cavo-polmonare deceduto dopo stadio III a distanza. Sulla base di questa analisi possiamo affermare che l'intervento di Norwood è ancora gravato da alta mortalità soprattutto dopo il I stadio di palliazione. 92% dei casi sono infatti deceduti dopo il I stadio e più della metà entro le 24 ore dopo la procedura. Le morti precoci sono da imputare ad ostruzione aortica, distorsione coronaria e trombosi o distorsione delle arterie polmonare o dello shunt.

Decessi tardivi sono da ascrivere a coartazione istmica, a disfunzione ventricolare e trombosi della anastomosi cavo-polmonare. L'ostruzione aortica è la prima tra le cause di insuccesso chirurgico: la mortalità precoce e perioperatoria è dovuta a inadeguata ricostruzione della neoarteria mentre le morti a distanza sono la conseguenza di ostruzioni localizzate nella regione istmica e tutte registrate in corso di angioplastica percutanea nel tentativo di dilatazione.

Sulla base di questi dati sono state suggerite e introdotte modificazioni tecniche alla procedura di ricostruzione della neoorta per superare il problema della coartazione istmica con resezione del tratto istmico e anastomosi terminale dell'aorta discendente.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 885/03/99

Responsabile Scientifico Baraldi Eugenio - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“L'ossido nitrico nell'aria espirata: un nuovo marker di immunoflogosi nell'asma”.

INTRODUZIONE

La bronchiolite da VRS colpisce i bambini nei primi due anni di vita, con un picco di incidenza verso i sei mesi di età. La bronchiolite rappresenta una delle cause più importanti di patologia polmonare nel primo anno di vita con un'incidenza del 10-15% di tutti i lattanti nei periodi di epidemia. Circa il 50% dei lattanti che hanno presentato una bronchiolite da Virus Respiratorio Sinciziale (VRS) presentano in seguito episodi ricorrenti di broncospasmo. Un'associazione tra bronchiolite e broncospasmo ricorrente è stata riconosciuta da almeno 30 anni (Minor 1974). Questa associazione è stata recentemente dimostrata anche in uno studio svedese su 47 pazienti ospedalizzati per bronchiolite da VRS nel 1° anno di vita con un follow-up di 7 anni (Sigurs 2000). In questo studio la prevalenza di bambini che hanno sviluppato asma è stata maggiore nel gruppo che aveva presentato bronchiolite rispetto al gruppo di controllo. L'infezione da VRS era il fattore di rischio più importante per lo sviluppo di broncospasmo e asma in età scolare. Molti studi di follow-up hanno mostrato, nei 4-8 anni successivi un episodio di bronchiolite, un'iperreattività bronchiale che in molti casi ha richiesto l'ospedalizzazione del paziente. La percentuale di pazienti con wheezing ricorrente in seguito ad un episodio di bronchiolite da VRS nei primi mesi di vita varia dal 20 all'80% a seconda delle varie casistiche.

SCOPO

L'ossido nitrico nell'aria espirata è un marker di infiammazione delle vie aeree i cui livelli sono elevati nei pazienti asmatici. Scopo di questo studio è valutare se la misura dell'ossido nitrico espirato (ENO) in bambini che hanno presentato bronchiolite nel primo anno di vita possa essere un marker predittivo di un successivo sviluppo di wheezing ricorrente. I bambini inclusi nello studio sono stati seguiti dopo la bronchiolite per 2-4 anni.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 41 bambini ricoverati per bronchiolite durante un periodo di epidemia presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova tra dicembre 1997 e marzo 1998 e tra gennaio ed aprile 2000. Sono stati arruolati pazienti di età inferiore ad un anno ricoverati con diagnosi di bronchiolite al primo episodio e che non avevano presentato precedenti episodi di wheezing. Nel 1998 sono stati arruolati 23 bambini (12 maschi e 11 femmine), tutti con aspirato naso-faringeo positivo per VRS (pazienti VRS+), nel 2000 sono stati arruolati 18 bambini di cui 10 (6 maschi, 4 femmine) con aspirato naso-faringeo positivo per VRS (pazienti VRS+) e 8 (2 maschi e 6 femmine) con aspirato naso-faringeo negativo per VRS (pazienti VRS-). Al momento del ricovero i bambini avevano un'età media di 6.7 ± 0.7 mesi nel 1998 e 2.6 ± 0.5 mesi nel 2000. Dopo la dimissione i bambini sono stati seguiti longitudinalmente e sono stati rivalutati a 2-4 mesi dalla bronchiolite, a 12-15 mesi, a 24-28 mesi e, i pazienti del gruppo del 1998, a 48 mesi dall'episodio di bronchiolite. Quando possibile, i pazienti venivano valutati anche quando, nel periodo di follow-up, presentavano riacutizzazioni di broncospasmo. Ad ogni visita venivano eseguite valutazione clinica ed anamnestica e misurazione dell'ossido nitrico nell'aria esalata. In occasione della prima visita veniva eseguito anche un prelievo per dosaggio di eosinofili sierici, ECP, IgE totali e specifiche.

Gruppo di controllo. Sono stati analizzati i valori di ossido nitrico esalato di 15 bambini sani con un'età media di 13.3 ± 2.6 mesi che non avevano storia di wheezing, malattie allergiche o dermatite atopica e che non avevano presentato infezioni alle alte vie respiratorie nelle tre settimane antecedenti lo studio.

RISULTATI

Pazienti con bronchiolite da virus respiratorio sinciziale (VRS+). I bambini che hanno presentato la bronchiolite nel 1998 (n=23) sono stati seguiti prospetticamente fino all'età di 4 anni, quelli che hanno presentato la bronchiolite nel 2000 (n= 18) sono stati seguiti fino all'età di 2 anni. Sono stati considerati assieme i 33 pazienti con bronchiolite VRS+ del 1998 e 2000: di questi 22 hanno presentato episodi di wheezing ricorrente (ricaduti) nei primi 24 mesi di follow-up (pari al 66%), mentre 11 (34%) non hanno presentato wheezing ma solo occasionali infezioni alle alte vie respiratorie senza broncospasmo (non ricaduti). Tutti gli episodi di wheezing ricorrente sono

stati documentati dal pediatra di famiglia o dai medici dell'unità di Pneumologia del Dipartimento di Pediatria di Padova.

- 1° controllo (a 2-4 mesi dal ricovero per bronchiolite). Tutti i pazienti hanno aderito al controllo a 2-4 mesi dalla bronchiolite. La misura dell'ossido nitrico si è dimostrata una tecnica di facile applicazione, non invasiva e semplice in tutti i bambini anche in quelli di pochi mesi di vita. L'ENO misurato alla prima visita post-bronchiolite (2-4 mesi) è risultato significativamente più elevato rispetto ai controlli sani nel gruppo dei ricaduti (7.6 ± 0.6 ppb vs 5.4 ± 0.4 ppb, $p < 0.05$) mentre non è risultato significativamente più elevato rispetto ai sani nel gruppo dei non ricaduti (6.0 ± 0.8 ppb vs 5.4 ± 0.4 ppb, $p = ns$). Nel confronto tra i 2 sottogruppi (ricaduti e non ricaduti) emerge una tendenza verso un valore più elevato di ENO nei ricaduti, che, però, non raggiunge significatività statistica. (7.6 ± 0.6 ppb vs 6.0 ± 0.8 ppb; $p = ns$).

- 2° controllo (a 12-15 mesi dal ricovero per bronchiolite). Ad 1 anno circa dalla bronchiolite (età 16.4 ± 0.9 mesi) la misurazione è stata fatta a 19 pazienti (15 ricaduti e 4 non ricaduti). I valori di ENO dei ricaduti persistevano significativamente più elevati rispetto a quelli dei sani (9.5 ± 1.6 ppb vs 5.4 ± 0.4 ppb; $p < 0.05$) mentre quelli del gruppo dei non ricaduti risultavano ridotti e simili a quelli dei sani (5.5 ± 1.7 ppb vs 5.4 ± 0.4 ppb; $p = ns$). Anche ad 1 anno dalla bronchiolite i valori medi di ENO risultavano maggiori nei pazienti ricaduti rispetto ai non ricaduti (9.5 ± 1.6 ppb vs 5.5 ± 1.7 ppb) senza, però, raggiungere significatività statistica ($p = 0.2$).

- 3° controllo (a 24-28 mesi). A 2 anni dalla bronchiolite hanno aderito al controllo 16 pazienti (13 ricaduti e 3 non ricaduti). Sette dei 13 pazienti ricaduti (54%) avevano presentato ricadute anche dopo il primo anno dalla bronchiolite mentre gli altri 6 (46%) non avevano più presentato ricadute dopo il primo anno. I 13 bambini ricaduti, la cui età era di 33.9 ± 1.5 mesi presentavano valori di ENO significativamente inferiori rispetto a quelli del 1° e 2° controllo (4.8 ± 0.4 ppb vs 7.6 ± 0.6 ppb e 4.8 ± 0.4 ppb vs 9.5 ± 1.6 ppb; $p < 0.05$) e sovrapponibili sia a quelli dei non ricaduti (4.8 ± 0.4 ppb vs 5.7 ± 1.9 ppb; $p = ns$) che a quelli dei bambini sani (4.8 ± 0.4 ppb vs 5.4 ± 0.4 ppb; $p = ns$). Solo 3 bambini del gruppo dei non ricaduti hanno partecipato al terzo controllo ed avevano un valore medio di ENO 5.7 ± 1.9 ppb

- 4° controllo (a 48 mesi). A 4 anni dalla bronchiolite tutti i pazienti sono stati contattati telefonicamente; quelli che non hanno effettuato l'ultima visita non avevano più presentato wheezing nell'ultimo anno. Hanno partecipato al controllo 10 pazienti (7 ricaduti e 3 non ricaduti), tutti arruolati nel 1998. Cinque dei 7 pazienti ricaduti (71%) avevano continuato a presentare episodi di wheezing anche nell'ultimo anno. I valori di ENO a questo controllo risultavano di poco superiori rispetto a quelli del controllo a 2 anni (6.6 ± 1.1 ppb vs 4.8 ± 0.4 ; $p = ns$) e non erano significativamente diversi rispetto a quelli dei sani (6.6 ± 1.1 ppb vs 5.4 ± 0.4 ; $p = ns$) che dei non ricaduti (6.6 ± 1.1 ppb vs 4.8 ± 2.0 ; $p = ns$).

- Controllo durante una fase di riacutizzazione. In 10 bambini è stato misurato l'ENO in fase di riacutizzazione del broncospasmo. Il valore di ENO risultava, in tale occasione, significativamente elevato rispetto ai valori misurati in assenza di malattia (20 ± 3.5 ppb vs 8.7 ± 1.1 ppb, $p < 0.01$).

I risultati di questo studio dimostrano che il 66% dei bambini che ha avuto un episodio di bronchiolite da VRS nel primo anno di vita ha poi presentato episodi di wheezing ricorrente nei mesi successivi. Tredici dei 23 pazienti ricaduti hanno continuato a presentare wheezing anche dopo il primo anno e cinque di questi pazienti presentavano wheezing anche dopo 4 anni dalla bronchiolite. I bambini ricaduti, nel primo anno dopo la bronchiolite, presentavano livelli di ossido nitrico nell'aria esalata (ENO) superiori a quelli dei controlli sani. A due anni di distanza dalla malattia i valori di ENO misurati nei ricaduti risultavano simili a quelli dei soggetti sani. Durante il follow-up del nostro studio i bambini ricaduti presentavano, in condizioni di benessere, valori di ossido nitrico esalato più elevati rispetto a quello dei bambini sani del gruppo di controllo; questo fa supporre che l'infiammazione delle vie aeree possa avere un ruolo importante nella bronchiolite e che si mantenga a distanza dall'episodio infettivo. E' da sottolineare, inoltre, che 8 pazienti ricaduti presentavano valori di $ENO > 9$ ppb, che può essere considerato il valore di cut-off di normalità, mentre tra i non ricaduti solo 1 bambino presentava $ENO > 9$, mentre gli altri presentavano valori inferiori. Quindi livelli elevati di ENO sembrano essere predittivi di wheezing ricorrente, mentre valori bassi non escludono la possibilità di ricorrenza di wheezing. Il nostro studio ha anche dimostrato che in corso di wheezing post-bronchiolite l'ENO aumenta in misura significativa con valori medi che arrivano a 20 ppb. Nel nostro studio è emersa una normalizzazione dei valori di ossido nitrico a distanza di due anni dall'episodio acuto di bronchiolite e considerando l'ENO un marker di infiammazione bronchiale si potrebbe supporre una progressiva riduzione fino a scomparsa della reazione infiammatoria indotta dal virus stesso a due anni di distanza. In conclusione, i valori di ENO nell'aria esalata nei mesi successivi ad una bronchiolite da VRS sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con wheezing ricorrente rispetto a dei bambini sani del gruppo di controllo. Il fatto che i valori di ENO nei pazienti con wheezing ricorrente siano rimasti elevati per tutto il primo anno di vita per ritornare a valori normali dopo il secondo anno sembra riflettere la persistenza di flogosi delle basse vie respiratorie che predispone il paziente a nuovi episodi di wheezing in caso di esposizione a fattori scatenanti. Nel confronto dei valori di ENO tra ricaduti e non ricaduti non è stata raggiunta

significatività statistica anche se la maggior parte dei ricaduti ha presentato valori di ENO elevati (>9ppb). La persistenza di valori di ENO esalato elevati dopo la bronchiolite è quindi risultato uno dei fattori di rischio per lo sviluppo di asma dopo una bronchiolite da VRS.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 886/05/99

Responsabile Scientifico Barelli Andrea - Ente Proponente ULSS 12 Veneziana

“Ricerca sulla diffusione delle malattie a trasmissione sessuale nel gruppo delle prostitute immigrate extracomunitarie presenti nel territorio dell'ULSS 12 finalizzata alla creazione di un modello preventivo ed assistenziale”.

Nel periodo di osservazione (18 mesi, gennaio 2001-agosto 2002) sono afferite e sottoposte a ricerca in maniera completa ai controlli previsti dal piano della ricerca (vedi allegato 1 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) 584 donne; non sono state incluse quelle che non hanno effettuato presso le Strutture coinvolte nella ricerca tutte le indagini previste o che non abbiano prodotto documentazione recente.

Si riporta nella tabella seguente la composizione per paese d'origine del gruppo di donne osservate.

PAESE DI PROVENIENZA	N.	%
NIGERIA	173	29.6
UCRAINA	167	28.5
MOLDAVIA	96	16.4
ROMANIA	49	8.4
ALBANIA	33	5.6
RUSSIA	11	1.9
SUD AMERICA	9	1.5
NORD AFRICA	8	1.3
ALTRI	38	6.5
TOTALE	584	100

L'età media del gruppo osservato era di 23,4 anni.

Dall'analisi dei dati raccolti è emerso in maniera significativa quanto segue:

- 8/584 (1.37%) sono risultate sieropositive per HIV (7 centro-africane, 1 est-europea); le donne di origine africana non presentavano altri rischi di contagio al di là di quello sessuale, la est-europea era anche tossicodipende.

- La prevalenza rilevata di lesioni condilomatose dell'area ano-genitale è stata del 24% (140/584); la ricerca dell'HPV su campioni istologici, tamponi o lavaggio vaginale è stata condotta su 215 pazienti con positività per ceppi a basso rischio nel 56% (121/215), alto rischio 17% (37/215), entrambi 19% (41/215); sono risultate negative il 7% (16/215).

- Non sono state riscontrate a lesioni displastiche cervicali di alto grado (H-SIL).

- Non è stato riscontrato neanche un isolamento di gonococco da tampone cervicale.

- La prevalenza di positività sierologica per lue è stata del 16.7% (98/584); si trattava nel 87% (85/98) di forme latenti; la sierologia è risultata con maggior frequenza positiva nelle donne provenienti dall'area est-europea (22%).

- La prevalenza di positività per HBsAg è risultata del 6% (35/584), in nessun caso si trattava di epatite acuta; la positività isolata per antiHBc è risultata del 29% (169/584); la sierologia per HBV ha dimostrato pertanto che il 35% aveva contratto l'infezione da parte di tale virus.

- L'intradermoreazione tubercolinica è risultata positiva nel 21% (122/584); solo in due casi si è riscontrata una malattia tubercolare (una linfadenite tubercolare ed una lesione polmonare cavitaria).

- E' stata istituita una sieroteca in cui abbiamo iniziato a raccogliere i sieri congelati delle donne esaminate; è nostra intenzione continuare a raccogliere tali sieri per eventuali future indagini sierologiche.

- Sono stati raccolti dati, non estesi a tutto il campione, su infezione da Chlamydia trachomatis, Micoplasma hominis, Ureaplasma Urealyticum, Trichomonas vaginalis, Herpes simplex, HCV, ectoparassitosi (scabbia e pediculosi del pube).

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

- Raccolta ed elaborazione di dati epidemiologici sulla popolazione di prostitute immigrate extracomunitarie, in particolare dati di prevalenza sulle principali malattie sessualmente trasmissibili, utili per l'elaborazione di modelli di screening e di campagne di prevenzione.
- Sono state maturate esperienze utili per migliorare la formazione degli operatori del sanitario e sociale, nonché quella dei mediatori culturali, impegnati nell'educazione sanitaria, con particolare riguardo alla prevenzione delle malattie sessualmente trasmissibili, della popolazione target.
- Si prevede definitiva ed estesa pubblicazione dei risultati ottenuti; tale pubblicazione sarà rivolta ad Operatori del Sociale, Infettivologi, Ginecologi, Microbiologi, Epidemiologi e Rappresentanti dell'Assessorato Regionale alla Sanità.
- Istituzione di una sieroteca per eventuali future indagini sierologiche su malattie infettive diverse da quelle già valutate.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 888/06/99

Responsabile Scientifico Bernardi Annamaria - Ente Proponente ULSS 18 di Rovigo

“Progetto di sviluppo di un sistema di rete informatica tra la U.O. di Nefrologia di Rovigo e i Servizi di Emodialisi di Trecenta, Adria e Porto Tolle (ULSS 19) per la gestione in tempo reale del paziente nefrologico (insufficienza renale cronica in terapia conservativa paziente in dialisi extracorporea o peritoneale, pazienti con trapianto renale) su tutto il territorio provinciale e per la validazione in termini di qualità, efficacia ed efficienza, delle prestazioni nefro-dialitiche somministrate”.

La ricerca è stata conclusa il 31/12/2001. Con i fondi erogati è stato possibile completare la rete geografica per la conduzione telematica della dialisi a livello provinciale, collegando Adria e Porto Tolle (Rovigo e Trecenta erano già state collegate con fondi della ASL 18). L'addestramento del personale medico e paramedico ha permesso di mettere in rete tutti i dati relativi ai pazienti uremici cronici trattati in Polesine, sicché in tempo reale è possibile seguire l'andamento della dialisi in ciascun punto assistenziale dialitico. E' possibile da parte del nefrologo aggiornare la cartella clinica computerizzata di ciascun paziente in dialisi o trapiantato renale che si presenti in ciascun punto di assistenza sparso sul territorio provinciale.

Attraverso questo sistema, che memorizza tutti i dati relativi a dialisi o trattamenti depurativi extracorporei, si ottiene anche il controllo giornaliero del materiale di consumo dialitico in modo che si può creare una specie di magazzino virtuale di carico e scarico del materiale, utile sia per la verifica amministrativa che per la gestione economica.

I risultati della Ricerca sono stati oggetto di relazione e pubblicazione al Convegno Nazionale ANTE (Associazione Nazionale Tecnici di Emodialisi) tenutosi a Gorizia nel maggio 2002.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 889/03/99

Responsabile Scientifico Berton Giorgio - Ente Proponente Università di Verona

“Ruolo di tirosin chinasi nella transmigrazione dei leucociti in siti infiammatori”.

Vengono qui riassunti i risultati ottenuti nel corso del primo anno di attività secondo i gruppi di obiettivi allora indicati.

I. Un primo gruppo di obiettivi era rappresentato dallo stabilire una stretta relazione tra tirosin chinasi della famiglia del Src e transmigrazione di cellule infiammatorie. Questi sono stati perseguiti mediante studi su modelli di infiammazione *in vivo* nel topo.

Uno dei modelli analizzati è stato quello dei topi "motheaten vitali". I topi "motheaten vitali" (*mev/mev*) hanno una quantità marcatamente ridotta di una tirosin fosfatasi (SHP-1) e sviluppano infiammazioni in diversi tessuti che determinano morte prematura. Ci siamo chiesti se l'inattivazione di *fgr* e *hck* in questi topi determinasse una riduzione degli infiltrati mielomonocitici nei tessuti. In collaborazione con il Dr. C.A. Lowell (UCSF; San Francisco) questi topi sono stati incrociati con topi difettivi di *c-Fgr* e *Hck* e abbiamo osservato una drammatica riduzione degli infiltrati infiammatoli nel polmone e nella cute dei topi *mev/mev* deficienti di *fgr* e *hck* ed un prolungamento della loro sopravvivenza, specialmente se trattati con antibiotici per controllare infezioni batteriche.

Nel corso di questi studi abbiamo osservato che una differenza maggiore nei macrofagi di topi wild-type, deficienti di chinasi per il Src, *mev/mev* o *mev/mev* deficienti di chinasi per il Src è rappresentata dal grado di

fosforilazione in tirosina della proteina adattatrice c-cbl, che è stata implicata nella traslocazione alla membrana plasmatica di PI-3 chinasi. Stiamo attualmente indagando il ruolo di c-cbl nella regolazione del movimento di macrofagi.

Il secondo modello sul quale stiamo lavorando è stato messo a punto nel nostro laboratorio ed è rappresentato da un modello di infiammazione allergica caratterizzata dall'infiltrazione di eosinofili nel polmone. In topi immunizzati con ovoalbumina (OVA), e successivamente esposti all'antigene per aerosol, si sviluppa una classica infiammazione allergica con infiltrazione di eosinofili nel polmone. Abbiamo trovato che l'accumulo di eosinofili nell'interstizio polmonare e nello spazio bronco-alveolare è fortemente ridotta nei topi *fgr-/-hck-/-*. Inoltre, abbiamo trovato che la sola deficienza di c-*fgr* è sufficiente a causare una marcata riduzione della transmigrazione eosinofila. Per comprendere i meccanismi che stanno alla base della ridotta infiltrazione eosinofila nel polmone in questo modello di asma abbiamo iniziato ad esaminare diversi aspetti di questa complessa risposta. Sulla base di risultati preliminari, ma già molto solidi, le nostre conclusioni possono essere così riassunte: a) la risposta di topi *fgr-/-hck-/-* al protocollo di immunizzazione è assolutamente normale perché i livelli serici di anticorpi IgG ed IgE specifici anti-OVA sono uguali in topi wild-type e knockout; b) aspetti classici dell'infiammazione allergica rappresentati da accumulo nello spazio bronco-alveolare di istamina, chemochine (RANTES, eotassina) e dalla citochina IL-4 sono normali in topi *fgr-/-hck-/-*; e) tuttavia, l'accumulo nello spazio bronco-alveolare di citochine come IL-5 e GM-CSF, che sono essenziali per la differenziazione degli eosinofili ed il loro "priming" e attivazione a rispondere a chemochine specifiche è totalmente difettivo in topi *fgr-/-hck-/-*. IL-5 e GM-CSF sono essenziali per lo sviluppo di infiammazione allergica e vengono rilasciate da differenti tipi di cellule comprese linfociti T, mastociti ed eosinofili. Poiché l'accumulo nello spazio bronco-alveolare di altre citochine prodotte da mastociti o T celi è uguale in topi wild-type o *fgr-/-hck-/-*, siamo convinti che la ridotta quantità di IL-5 e GM-CSF trovata nello spazio bronco-alveolare di topi *fgr-/-hck-/-* rifletta una ridotta infiltrazione di eosinofili nel polmone. Sulla base di questa visione, la transmigrazione di eosinofili nel polmone svolgerebbe un ruolo di amplificazione positiva dell'infiammazione allergica dovuta al fatto che gli eosinofili rilasciano IL-5 e GM-CSF una volta migrati nel contesto del parenchima polmonare. Un difetto di infiltrazione di eosinofili in seguito alla mancanza di *Fgr* e *Hck* bloccherebbe l'innescò di questo circuito a feed back positivo. Per validare questa ipotesi verranno condotti i seguenti esperimenti: a) l'analisi del profilo citochinico nello spazio bronco-alveolare verrà esteso ai topi *fgr-/-* per rinforzare la nozione che un diminuito accumulo di eosinofili nel parenchima polmonare correla con una diminuita produzione di IL-5 e GM-CSF. b) la transmigrazione ed il movimento degli eosinofili verrà analizzato sia in vivo che in vitro. Per l'analisi in vivo utilizzeremo protocolli che non si basano sulla sensibilizzazione dell'animale ma riflettono semplicemente la transmigrazione di cellule in risposta a citochine specifiche, vale a dire l'accumulo di eosinofili nella cavità peritoneale alcune ore dopo l'iniezione i.p. di eotassina, una chemochina eosinofilo-specifica. Per studi in vitro, sfrutteremo la nostra esperienza sull'analisi della migrazione di cellule attraverso "transwell". Cellule del midollo osseo - delle quali gli eosinofili rappresentano circa il 15% - verranno usate a questo scopo, quantificando la migrazione specifica di eosinofili in risposta a eotassina attraverso filtri ricoperti o no di endotelio, e) esamineremo con maggior dettaglio la capacità di linfociti T e macrofagi di rispondere ad OVA in seguito alla sensibilizzazione dell'animale. A questo scopo, cellule spleniche di animali wild-type, *fgr-/-hck-/-* o *fgr-/-* sensibilizzati con OVA, verranno stimulate in vitro con OVA e le citochine accumulate nel soprannatante di coltura dosate mediante appropriati kit commerciali.

Il primo gruppo di risultati ottenuti con questo modello sperimentale è stato pubblicato (vedi allegato: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

II. Uno dei nostri obiettivi riguardava l'identificazione dei possibili meccanismi con cui chinasi della famiglia del Src regolano la transmigrazione di neutrofili in siti infiammati. Abbiamo potuto concludere che il difetto di queste chinasi non altera l'interazione selectina-dipendente e la localizzazione di L-selectina sulla membrana dei neutrofili; non altera l'adesione rapida dipendente da modificazioni dell'affinità integrinica; altera però l'adesione salda dipendente da riarrangiamento del citoscheletro successivo all'interazione integrina-ligando. Utilizzando avanzate metodologie di studio dell'adesione e del rolling sotto flusso abbiamo confermato che il difetto di adesione osservabile in condizioni statiche, riflette un più facile distacco dalla superficie

endoteliale determinata dal flusso sanguigno. Tali risultati verranno in breve elaborati per la pubblicazione.

III. Uno dei nostri obiettivi era di analizzare in dettaglio il ruolo della tirosin chinasi c-Fgr che regola il movimento cellulare. Siamo recentemente riusciti a ricostruire un modello di movimento c-Fgr-dipendente in cellule COS transfettate con costrutti contenenti il gene c-fgr fuso con quello della Green Fluorescent Protein (GFP). I risultati ottenuti, e non ancora pubblicati, possono essere riassunti in questo modo. I costrutti utilizzati includono: i) c-fgr full-length (FgrGFP); ii) c-fgr con una delezione dei primi sette aminoacidi che comprendono la glicina e la cisteina implicate nella miristilazione e palmitazione della proteina (DeltaSH4FgrGFP); iii) c-fgr con una delezione dell'intero dominio SH1, vale a dire il dominio responsabile dell'attività enzimatica (DeltaSH1FgrGFP). Analisi mediante western blotting di lisati di COS transfettate con i diversi costrutti hanno mostrato espressione comparabile di proteina. Inoltre, l'attività chinasi di Fgr (sia come autofosforilazione che come fosforilazione del substrato esogeno enolasi) è comparabile in lisati di COS transfettati con FgrGFP o DeltaSH4FgrGFP, mentre in cellule transfettate con DeltaSH1 FgrGFP non è evidenziabile nessuna attività. Analisi al microscopio confocale di COS transfettate con questi diversi costrutti ha mostrato che, mentre in COS transfettate con un costrutto GFP di controllo o con DeltaSH4FgrGFP, la fluorescenza dovuta a GFP è uniformemente diffusa in tutto il citoplasma, in cellule transfettate con c-Fgr full-length o DeltaSH1FgrGFP, la fluorescenza GFP si distribuisce in "ruffles" di membrana alla periferia della cellula. Contro-colorazione di cellule COS, transfettate con i costrutti FgrGFP, con rodamina-falloidina hanno mostrato che il c-Fgr ridistribuito ai "ruffles" di membrana co-localizza con F-actina. Inoltre cellule COS transfettate con FgrGFP o DeltaSH1FgrGFP assumono una morfologia più polarizzata se confrontata con quella di COS transfettate con GFP o DeltaSH4FgrGFP. Abbiamo anche analizzato se c-Fgr aumenta il movimento di cellule COS. A questo scopo abbiamo messo a punto un classico saggio di "aptotassi" (movimento indotto da integrine), basato sulla conta di cellule migrate attraverso un filtro di policarbonato con fori da 8 micron e ricoperto da proteine della matrice extracellulare. In diversi esperimenti di aptotassi in cellule COS transfettate abbiamo osservato che, mentre COS esperimenti FgrGFP full length mostravano un aumento di 4-7 volte della migrazione aptotattica, se comparata con quella di cellule transfettate con la sola GFP, l'aptotassi di COS esperimenti DeltaSH4FgrGFP era comparabile a quella di COS esperimenti GFP da sola, mentre quella di cellule transfettate con DeltaSH1FgrGFP era solo parzialmente inibita. Questa osservazione suggerisce che la capacità di c-Fgr di regolare il movimento dipende principalmente dalla sua localizzazione di membrana, mentre la sua attività chinasi ha un ruolo solo marginale. Queste osservazioni mettono questa unità operativa in condizioni di analizzare in dettaglio la via di trasduzione del segnale c-Fgr-dipendente ed implicata nella regolazione del movimento e di altre risposte integrine-dipendente. Fgr aumenta la fosforilazione in tirosina della subunità regolatrice (p85) della fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K), di cortactina e di "focal adhesion kinase" (FAK) nei residui 397 e 576. Fgr si associa con FAK e Finibitore negativo di Rho, p190RhoGAP, aumentando i suoi livelli di fosforilazione in tirosina. Fosforilazione di p85, FAK, cortactina e p190RhoGAP sono dipendenti sia dall'attività chinasi di Fgr che dalla sua localizzazione alla membrana plasmatica. Sia Fgr completo che difettivo dal punto di vista dell'attività enzimatica si associa a FAK e p190RhoGAP, mentre la sua distribuzione in un comparto intracellulare previene tale associazione. Fgr aumenta la forma attiva, legata al GIP, di Rac in modo totalmente dipendente dalla sua associazione a membrana, ma parzialmente indipendente dalla sua attività chinasi. Quindi, Fgr regola il movimento cellulare interagendo con FAK e determinando aumentata fosforilazione di diversi substrati tra cui p190RhoGAP, la cui fosforilazione e attivazione da parte di Src è considerata centrale nel favorire il rapido turnover di contatti focali ed il movimento cellulare. Inoltre, Fgr attiva Rac, una componente essenziale per favorire la polimerizzazione del F-actina nel fronte delle cellule in movimento. Tale attivazione dipende in parte dall'attività chinasi di Fgr ed in parte da una sua attività come proteina adattatrice in grado di interagire con altre molecole. Questi due diversi meccanismi di stimolazione del movimento da parte di Fgr devono essere ora caratterizzati.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 891/03/99

Responsabile Scientifico Caforio Alida e Linda Patrizia - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Miocarditi: approccio clinico su base immunologico molecolare ed implicazioni terapeutiche”.

Reclutamento, caratterizzazione clinica e follow-up dei pazienti con sospetta miocardite.

Il nostro studio doveva comprendere: 1) reclutamento, caratterizzazione clinico-strumentale, immunologica e follow-up dei pazienti con miocardite e di controlli con cardiomiopatia dilatativa idiopatica e con cardiopatie non infiammatorie. In questi anni la ricerca del nostro gruppo è stata pertanto rivolta al reclutamento e alla caratterizzazione clinico/diagnostica dei pazienti con miocardite e dei controlli.

Sono stati studiati 100 casi di miocardite, di cui 76 reclutati a partire dall'inizio della presente ricerca, tra quelli con 1) scompenso cardiaco ad eziologia incerta, 2) sindromi simil-infartuali a coronarie angiograficamente indenni, 3) aritmie gravi a genesi ignota, 4) aritmie sintomatiche in presenza di disfunzione ventricolare sinistra (FÉ angiografica o ecocardiografica <A5%), 5) candidati al trapianto cardiaco. Sono disponibili dati clinici, biotipici, e campioni di siero. Sono stati consensualmente acquisiti gruppi di controllo costituiti da 120 pazienti con cardiomiopatia dilatativa idiopatica e 92 con scompenso cardiaco dovuto ad altre cause, di cui sono altresì disponibili dati clinico-strumentali e campioni di siero. Tutti i pazienti studiati sono stati sottoposti a caratterizzazione non invasiva ed invasiva, comprensiva di cateterismo cardiaco completo, ventricolografia sinistra e coronarografia selettiva. Inoltre nei pazienti con sospetta miocardite o cardiomiopatia dilatativa sono state effettuate le determinazioni sierologiche dei titoli anticorpali per comuni virus cardiotropi, nonché la biopsia endomiocardica ventricolare destra (almeno 4 frustoli). La diagnosi di cardiomiopatia dilatativa si è basata sulla dimostrazione di un ventricolo sinistro dilatato ed ipocinetico a genesi ignota, secondo i criteri OMS. La diagnosi di miocardite è stata posta secondo i criteri di Dallas ed il fenotipo immunologico dell'infiltrato infiammatorio è stato determinato e quantificato mediante metodiche immunoistochimiche. I pazienti con miocardite sono sottoposti a monitoraggio clinico, e strumentale non invasivo, al fine di valutare la risposta al trattamento, l'evoluzione del quadro istopatologico, e la prognosi.

La miocardite è una sindrome clinico-patologica eterogenea; i fattori prognostici sono controversi. I 100 pazienti consecutivi inclusi nello studio (età media 32 ± 19 anni, 62 maschi presentavano i seguenti reperti istologici alla biopsia: 91 miocarditi linfocitarie, 3 polimorfe, 4 gigantocellulari, 1 eosinofila e 1 sarcoidea. 22 pz avevano avuto nei 6 mesi precedenti una diagnosi di miocardite. Diciotto pazienti presentavano aritmie e/o sincope (gruppo I), 61 disfunzione ventricolare sinistra sintomatica o asintomatica (gruppo O), 21 angor a riposo con aumento degli enzimi di miocardiocitolisi (gruppo III). Alla diagnosi 40 pazienti erano in I classe NYHA, 14 in II, 40 in III e 6 in IV; 4 pazienti erano in fibrillazione atriale, 10 avevano un blocco AV, 9 un blocco di branca sinistra, 14 alterazioni ST e/o dell'onda T; all' ecocardiogramma il volume telediastolico del ventricolo sinistro (VTD) risultava di 105 ± 49 ml/m² e la frazione di eiezione (FÉ) di 41 ± 14 % (17-72). Al cateterismo cardiaco la pressione atriale destra media (RAm) era di 5 ± 5 mmHg (0-25), e la frazione di eiezione del ventricolo sinistro (LVEF) di 43 ± 18 % (15-82). Il follow-up di 82 su 100 pz è stato di 30 ± 39 mesi. Abbiamo paragonato (analisi della varianza) le variabili clinico-strumentali, alla diagnosi, nei vivi vs morti/trapiantati e nei 3 gruppi a diversa presentazione. Al follow-up 61 pazienti erano vivi (74 %) e 21 morti o trapiantati (26 %). Al follow-up dei pz vivi non trapiantati 48 (79%) erano in I classe NYHA, 12 (19%) in II e 1 (2%) in III, con FÉ pari a 51 ± 13 %. Fattori prognostici predittivi di morte o trapianto erano: RAm elevata (10 ± 7 vs 4 ± 3 mmHg, $p=0.0001$); LVEF angiografica (27 ± 16 vs 46 ± 17 %, $p=0.004$) ed FÉ all'ecocardiogramma ridotte (30 ± 10 vs 44 ± 14 %, $p=0.003$). In rapporto alla presentazione clinica, i pazienti nel gruppo II avevano minore LVEF ($p=0.0001$), minore FÉ ($p=0.0001$), maggiore VTD ($p=0.0001$) alla diagnosi e maggiore numero di morti o trapiantati al follow-up (38.5%, $p=0.008$) rispetto ai restanti gruppi.

In conclusione, la miocardite si associa a mortalità elevata nel breve termine (30% a 3 anni). La disfunzione ventricolare sinistra sintomatica o asintomatica è la presentazione più frequente; ciò sottolinea la necessità della biopsia endomiocardica nei pazienti con disfunzione ventricolare e coronarie indenni. Il principale fattore prognostico negativo appare essere l'entità della riduzione degli indici di funzione ventricolare. La prognosi appare invece più favorevole in pazienti a presentazione aritmica e simil-infartuale.

Identificazione di agenti infettivi mediante metodiche molecolari.

In 70 dei 76 casi reclutati dall'inizio della presente ricerca (92%) è stato tecnicamente possibile eseguire uno studio molecolare mediante PCR/RT-PCR e sequenziamento genico per l'identificazione e caratterizzazione dei principali agenti infettivi cardiotropi: Enterovirus, Adenovirus, Herpesvirus (Citomegalovirus, Epstein-Barr ed Herpes simplex), Paramixovirus e virus dell'epatite C, Parvovirus B19. In ciascun caso positivo si è proceduto

all'identificazione della forma virale latente o attiva dell'infezione. 32 biopsie endomiocardiche di controllo da pazienti affetti da patologia non infiammatoria sono state processate secondo il medesimo protocollo.

Nei 25 casi di miocardite risultati positivi sono state eseguite le medesime indagini anche su campione ematico prelevato contestualmente alla biopsia endomiocardica; pertanto la frequenza delle miocarditi virali è risultata pari a 36% dei casi studiati. Il ceppo virale più frequentemente identificato era l'Enterovirus (9 casi su 25, 36%), seguito da Adeno virus (5/25 casi, 20%), e virus di Epstein-Barr (4/25 casi, 16%). Virus meno comunemente identificati erano il Parvovirus B19 (2/25, 8%), nonché Herpes simplex(1/25, 4%), Paramixovirus (1/25, 4%), Citomegalovirus (1/25,4%), morbillo(1/25,4%), epatite C (1/25,4%). Tali frequenze sono in accordo coi dati della letteratura, secondo cui Enterovirus ed Adenovirus sono i patogeni più frequentemente coinvolti nei pazienti adulti con miocardite istologicamente provata. Nei restanti casi risultati negativi per la presenza di genoma virale, ossia in 45/70, pari al 51%, è quindi probabile che la miocardite sia a genesi autoimmune.

Identificazione di anticorpi anti-cuore organo-specifici circolanti.

E' stato acquisito, con fondi non compresi nella presente ricerca, un microscopio biologico "Zeiss Axioplan 2 imaging" per luce trasmessa e predisposto per epifluorescenza, corredo base ed accessori, indispensabile per la caratterizzazione immunologica, mediante determinazione degli autoanticorpi anti-cuore organo-specifici circolanti, nel siero dei pazienti con miocardite e dei controlli. Per la caratterizzazione immunologica ci si è avvalsi della collaborazione della sig. Fiorello Irene dal 27/9/2002 al 17/2/2003. In 32 dei 76 casi di miocardite reclutati dall'inizio della presente ricerca (42%) è stata eseguita la determinazione sierologica, con 11 casi anticorpo-positivi su 32 (34%). In nessuno dei casi anticorpo-positivi veniva identificato genoma virale. E' in via di completamento l'analisi dei dati immunologia al fine di stabilire il potenziale significato prognostico dell'eziologia (infettiva vs autoimmune).

Conclusioni

I risultati della presente ricerca sono promettenti, in quanto indicano la fattibilità dell'identificazione di sottogruppi distinti per eziologia (infettiva in presenza di PCR positiva, autoimmune in presenza di PCR negativa con o senza positività anticorpale) e pongono le premesse per un trial clinico randomizzato che preveda il trattamento con farmaci antivirali o immunomodulanti nelle forme virali e con immunosoppressori nelle miocarditi autoimmuni.

Prodotti della ricerca

1) Archivi elettronici dei dati.

Sono stati creati, utilizzando il programma di archiviazione dati ed analisi statistica Statview SE+graphics, per Apple Macintosh, IBM compatibile, database che includono dati anamnestici, clinici, diagnostico-strumentali, immunologici e molecolari dei pazienti con miocardite, e di quelli affetti da cardiomiopatia dilatativa, reclutati nello studio.

2) Raccolta di materiale congelato (biopsie endomiocardiche e siero).

Sono stati costituiti archivi di materiale biologico congelato (biopsie endomiocardiche e siero) sui pazienti con miocardite, con cardiomiopatia dilatativa e relativi controlli inclusi nello studio.

3) Pubblicazioni per estenso su riviste recensite e con "impact factor"

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 892/06/99 E 955/06/99

Responsabile Scientifico Capirossi Giuseppina e Vallicella Franco - Ente Proponente ULSS 20 di Verona e ULSS 22 di Bussolengo

“Processi di provata efficacia e relativi indicatori per il buon funzionamento dei servizi infermieristici”.

La ricerca condotta ha permesso di evidenziare secondo diversi punti di vista, alcuni elementi che assumono un ruolo determinante per l'organizzazione del sistema infermieristico e del complessivo sistema aziendale e per l'esercizio delle funzioni di management da parte delle direzioni aziendali. Emergono infatti almeno due importanti considerazioni rispetto ai Servizi Infermieristici; la prima attiene al modello organizzativo del Servizio quale *sistema di governo* della professione infermieristica, la seconda riguarda il valore che possono assumere gli indicatori descritti nella ricerca in una prospettiva di miglioramento continuo sia dei Servizi Infermieristici che dell'organizzazione aziendale complessiva .

Per quanto riguarda il modello organizzativo, i dati raccolti sia nelle cinque aziende coinvolte nella ricerca, che quelli acquisiti attraverso la revisione dei documenti forniti dalle altre aziende della regione e da esperienze significative maturate in ambito nazionale ed internazionale, sono una chiara conferma della necessità di presidiare determinate aree di responsabilità ed i relativi processi ed attività riconducibili alla professione infermieristica. Ciò

è reso possibile solo in presenza di Servizi chiaramente strutturati e realizzando quelle condizioni ritenute essenziali per poter garantire la gestione e la programmazione delle risorse, per assicurare la qualità e lo sviluppo professionale, per presidiare lo stato di fatto e governare il cambiamento, laddove necessario, dei modelli organizzativi ed assistenziali. In tal senso, risulta ad esempio determinante, la possibilità di assegnare a ciascuna area del servizio (ospedaliera, territoriale, formazione, qualità e ricerca) un responsabile, garantendo così al dirigente del servizio la possibilità di occuparsi in via esclusiva della funzione di direzione.

La prima riflessione è strettamente connessa alla seconda, perché proprio gli indicatori descritti rappresentano le condizioni a cui fare riferimento sia per la costituzione dei servizi che per il loro sviluppo. Lo scenario che si delinea con la descrizione degli indicatori organizzativo/gestionali per il buon funzionamento dei Servizi Infermieristici, evidenzia il ruolo che già gli stessi assumono nelle aziende nel presidiare quei processi organizzativo-gestionali che condizionano poi le strategie aziendali, ma delinea anche prospettive di evoluzione particolarmente significative, ad esempio per quanto riguarda l'accreditamento professionale. Non a caso si è voluto partire proprio dall'analisi dell'esistente, ritenendo indispensabile un'approfondita conoscenza dello stato dell'arte prima di delineare scenari futuri, recuperando l'esperienza finora maturata dai Servizi Infermieristici e gli elementi positivi che l'hanno contraddistinta, introducendo però quegli elementi che riconducono i comportamenti dei professionisti e le scelte aziendali a chiare valutazioni in merito alla reale efficacia delle decisioni assunte; ciò permette anche di valutare i risultati ottenuti rispetto alle attività poste in essere, di esprimere giudizi pertinenti in termini di efficacia ed efficienza, di confrontare situazioni organizzative concrete con altre esperienze o con la letteratura esistente, di impegnare infine i professionisti nella ricerca delle soluzioni organizzative migliori.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 894/06/99

Responsabile Scientifico Casson Paola - Ente Proponente ULSS 9 di Treviso

“Processi di provata efficacia e relativi indicatori per il buon funzionamento dei servizi infermieristici”.

La ricerca svolta ha permesso di rilevare e analizzare le aree di responsabilità, i processi, le attività che fanno ad oggi capo ai Servizi Infermieristici delle cinque aziende che hanno partecipato al gruppo di lavoro al fine di comprenderne il ruolo nell'ambito dell'assetto organizzativo aziendale. Questa prima considerazione è risultata fondamentale per leggere gli spazi d'azione ed i vincoli di manovra in capo al Responsabile/Referenti d'Area dello stesso, in quanto esplicitativi di una legittimità nel prendere alcune decisioni gestionali e d'impatto sia sull'operatività aziendale che su ambiti maggiormente strategici e di programmazione generale.

Con il termine **indicatori di buon funzionamento** quindi si è inteso elencare quel set di indicatori di attività, frutto dell'analisi e della comparazione delle cinque unità organizzative interessate, che consentono di verificare come i Servizi Infermieristici presidiano le aree di responsabilità riconosciute nell'organizzazione del lavoro e sono fornitori/clienti interni di informazioni o strumenti utili all'espletamento della funzione manageriale aziendale.

La lettura dei dati raccolti sottolinea una omogeneità delle funzioni e delle attività esercitate dai cinque Servizi, evidenziando come, gli spazi aziendali di cui godono, sono pressoché simili (aspetto questo confermato anche dalla medesima collocazione organizzativa e dalle delibere d'azienda in merito all'istituzione dei Servizi).

Nonostante questa prima riflessione di ordine generale, vi è comunque un aspetto importante e che vale la pena qui sottolineare in quanto determinante per il ruolo attuale e futuro svolto dal Servizio nella macrostruttura e nel rapporto con gli altri organi/ruoli di direzione e di governo: la presenza di un responsabile per ognuna delle quattro aree di cui si compone il Servizio – area ospedaliera, area territoriale, formazione, qualità - (cinque nel caso dell'azienda ULSS 9 che ha al suo interno anche la formazione universitaria) e, conseguentemente, l'esclusività della figura del dirigente responsabile del Servizio.

Le aree governate dagli indicatori sopra riportati si riferiscono alle seguenti tematiche:

- principi generali in merito all'organizzazione del Servizio e delle attività proprie e/o con ricaduta sugli standard assistenziali delle UU.OO/Dipartimenti dell'azienda;
- principi generali in merito al personale governato dal Servizio, sia in qualità di organico dell'unità organizzativa che dotazione organica delle UU.OO/Dipartimenti;
- principi generali in merito all'assistenza ai pazienti da parte dei professionisti afferenti all'azienda;
- principi generali in merito alla predisposizione, applicazione e revisione di norme e procedure dell'attività assistenziale effettuate dai professionisti dell'azienda;
- principi generali in merito alla formazione dei professionisti afferenti all'azienda;
- principi generali in merito alle risorse e attrezzature necessarie al Servizio per espletare la propria attività;

- principi generali in merito al miglioramento continuo dell'assistenza mediante un continuo coinvolgimento del programma di Qualità Totale dell'azienda.

La logica evoluzione di questo scenario organizzativo è la presenza di un Servizio aziendale posto nelle condizioni di esercitare funzioni di pianificazione strategica per quanto riguarda le politiche di programmazione della risorsa infermieristica e per lo sviluppo professionale anche attraverso l'adozione di modelli organizzativi ed assistenziali innovativi e comunque coerenti con il sistema sanitario nel quale sono collocati, e funzioni di direzione operativa per la corretta allocazione delle risorse nell'ambito delle strutture aziendali; un Servizio fornitore e cliente interno di informazioni e strumenti di fondamentale importanza in alcuni processi decisionali, disposto ad affermare il diverso ruolo esercitato nel contesto aziendale (secondo quanto scritto nel paragrafo precedente) avviando procedure di certificazione istituzionale, di accreditamento dell'eccellenza o di accreditamento affidato alle associazioni professionali.

Nel primo caso si tratta di identificare e certificare l'esistenza dei criteri minimi sanciti da leggi e regolamenti istituzionali; nel secondo caso si vogliono identificare i meriti delle strutture eccellenti, stimolando quelle con standard inferiori a migliorare la qualità del loro lavoro, nel terzo caso si tratta di processi affidati alle associazioni con le caratteristiche di indipendenza e che dispongono delle competenze necessarie per l'elaborazione degli standard e per la valutazione dei professionisti e delle strutture.

Nell'ottica sopra descritta vi sarebbero allora ulteriori aree di responsabilità del Servizio da cui estrapolare indicatori di buon funzionamento, che in una rilettura complessiva delle motivazioni alla base del presente lavoro dovrebbero essere condizione preliminare alla definizione degli ulteriori standard per una efficiente organizzazione del Servizio.

Obiettivo dell'ultima fase del lavoro di ricerca è consolidare il percorso fin qui condiviso dalle cinque aziende sanitarie affinché:

- le aree di responsabilità ed i connessi indicatori di verifica diventino effettivamente presenti ed operanti nelle unità organizzative infermieristiche oggetto d'indagine,
- siano elementi su cui commisurare la buona funzionalità di tutti i Servizi Infermieristici delle aziende della Regione Veneto pur in un'ottica di miglioramento continuo degli stessi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 896/02/99

Responsabile Scientifico Castagnaro Massimo - Ente Proponente Università di Padova

“Sequenziamento e studio dei geni BRCA-I BRCA-II recettore degli androgeni (AR) recettore del progesterone (PR) e recettore degli estrogeni (ER) nei tumori mammari del gatto come modello animale del cancro mammario ormono resistente e familiare della donna”.

Lo scopo generale della presente ricerca è quello di correlare il tumore mammario felino con quello della donna, in modo particolare per quanto riguarda il profilo ormonale.

Diversi studi condotti negli ultimi anni sui carcinomi mammari nella donna hanno dimostrato che meccanismi complessi controllano l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER) sia nel tessuto sano, sia in quello tumorale. In particolare, la presenza a livello del tessuto neoplastico di isoforme alternative dell'RNA messaggero (mRNA) codificante l'ER sembra essere correlata con la progressione tumorale, ed in particolare con la diminuita sensibilità ai farmaci con effetto antagonista a quello degli estrogeni.

Il primo passo della ricerca è stato quello di ottenere la sequenza del gene recettore degli estrogeni del gatto. La sequenza dell'mRNA dell'ER nell'uomo misura 6450 paia di basi, di cui 1795 di sequenza codificante la proteina, mentre la relativa regione genomica suddivisa in otto esoni e otto introni è lunga oltre 290000 paia di basi. Tali dimensioni ponevano dunque delle difficoltà metodologiche che sono state superate mediante l'isolamento della porzione trascritta (mRNA) con una tecnica denominata “Rapid Amplification of cDNA Ends” (RACE). Il primo passaggio è consistito nell'estrazione dell'RNA totale da cellule di ovario di gatto. L'RNA è stato quindi retrotrascritto a cDNA mediante un enzima, la trascrittasi inversa. Sono stati costruiti dei “primer degenerati” sulla base delle sequenze di ER presenti per altre specie di mammiferi, che sono stati usati in una reazione di amplificazione in vitro del DNA (PCR). Il prodotto ottenuto è stato sequenziato e a partire da questa sequenza parziale di ER felino, si è sviluppata la metodica RACE per ottenere le regioni a monte e a valle di quella già determinata. Questa procedura sperimentale ha portato al sequenziamento completo dell'mRNA di ER nel gatto. Il messaggero completo misura 4500 paia di basi di cui 1795 codificanti. Il confronto con la sequenza umana ha dimostrato l'elevata somiglianza (similarità > 94%) tra quest'ultima e la sequenza dell'ER felino. La sequenza completa è disponibile su richiesta presso il laboratorio del Prof. Castagnaro. Sono state inoltre evidenziate delle isoforme alternative di mRNA determinate da diversi punti di inizio della trascrizione (tre esoni iniziali alternativi), così come già osservato per l'ER nell'uomo. Sulla base della sequenza così ottenuta è stato infine

sviluppato un saggio qualitativo-quantitativo per la determinazione della presenza del recettore nei tessuti in esame.

In aggiunta alla caratterizzazione molecolare dell'ER felino, nel corso del progetto è stato studiato un secondo gene di fondamentale importanza nei tumori mammari umani, in particolare nel determinare il grado di invasività del tumore stesso. Il gene codificante la proteina STK-Stk fa parte infatti una famiglia di oncogeni riconducibili al prototipo MET. Le proteine della famiglia MET sono delle tirosin-chinasi, con funzione di recettori di membrana che trasducono i segnali extracellulari all'interno della cellula. In particolare, l'attivazione di STK determina nella cellula bersaglio la dissociazione dalle altre cellule, un effetto di "scattering", il passaggio attraverso le membrane basali e la costituzione ectopica di strutture tubulari. Da questo si può comprendere l'importanza di questa molecola nel determinare un'aumentata invasività delle cellule tumorali, e dunque nel rendere il tumore stesso più aggressivo favorendo la formazione di metastasi. Un'aumentata espressione di STK è stata infatti osservata in molti tumori mammari umani.

Analogamente a quanto già descritto per l'ER, attraverso il confronto di sequenze di STK già note, sono stati sviluppati dei primer per amplificare gli esoni 11 e 14 del gene nel gatto. La sequenza dei due amplificati ha permesso di sviluppare primer specifici per il gatto, che sono stati utilizzati in un saggio di RT-PCR per l'analisi dell'espressione di STK in tumori mammari felini. Dopo estrazione dell'RNA totale ed amplificazione del gene STK da otto campioni di adenocarcinoma infiltrante, sette tumori hanno dato un segnale positivo, ad indicare un livello misurabile di espressione per questo oncogene. Inoltre, da tre campioni è stato ottenuto un estratto proteico totale, che è sottoposto a elettroforesi su gel di poliacrilamide, insieme a estratti proteici umani usati come controlli positivi. La presenza di una banda elettroforetica costituita dalla proteina STK felina è stata dimostrata mediante la tecnica del Wester-blot, grazie all'utilizzo di un anticorpo policlonale che riconosce in modo specifico la proteina stessa. Una volta dimostrata la specificità di legame proteina-anticorpo, quest'ultimo è stato utilizzato in un'indagine immunostochimica condotta su 34 tumori mammari felini reperiti nell'archivio del servizio di Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Padova. Tali campioni erano tutti adenocarcinomi mammari infiltranti e comprendevano cinque tumori di tipo papillare, 12 di tipo solido e 17 di tipo tubulare. Su 34 campioni esaminati, 10 sono risultati altamente positivi per la presenza della proteina STK, in modo paragonabile a quanto osservato per i carcinomi mammari umani.

L'obiettivo, pienamente conseguito, di questo progetto era dunque l'utilizzo di metodiche avanzate di tipo molecolare nello studio delle NFM, per verificarne le corrispondenze con il carcinoma mammario della donna. I risultati ottenuti, infatti, indicano che le NMF rappresentano un eccellente modello animale spontaneo per i carcinomi mammari umani, anche quando la caratterizzazione del tumore è condotta al livello più fine, quello molecolare. Inoltre, la dimostrata possibilità di utilizzare campioni di archivio apre all'analisi molecolare un vastissimo numero di NMF, che potranno essere utilizzate in un confronto sempre più dettagliato a livello molecolare con i corrispondenti tipi derivanti dalla patologia umana.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 899/05/99

Responsabile Scientifico Cigolini Massimo - Ente Proponente ULSS 5 Ovest Vicentino

“Studio dell'allestimento di un osservatorio epidemiologico relativo al paziente extracomunitario ricoverato in ambito ospedaliero ed al suo nucleo familiare con lo scopo di fornire periodicamente dati utili al lavoro di medici ed infermieri operanti in ospedale e sul territorio in un Comune con altissima presenza di extracomunitari”.

E' stato eseguito il censimento dei pazienti extracomunitari afferenti agli ambulatori di Arzignano -Montecchio Maggiore e Lonigo del Servizio Diabetologico dell'ULSS n° 5. Sono così stati identificati 143 pazienti diabetici extracomunitari corrispondenti al 4,2% dei pazienti diabetici regolarmente seguiti dal Servizio Diabetologico stesso. Si fa presente che la popolazione extracomunitaria è intorno al 10% della popolazione generale ma l'età media degli extracomunitari residenti è sensibilmente inferiore a quella della popolazione generale indigena. Comprensibile per tanto che i diabetici extracomunitari seguiti siano percentualmente meno di quelli presenti.

- E' stato condotto un intervento terapeutico diabetologico intensivo su questi pazienti diabetici extracomunitari motivato dal fatto che presentavano un controllo glico-metabolico significativamente peggiore rispetto a quello di un gruppo confrontabile di diabetici indigeni (Emoglobina glicosilata 8,7 +/- 2,3% Versus 7,1 +/- 1,9 % P= 0,002). L'intervento è consistito in visite diabetologiche dedicate ad una educazione intensiva anche mediante dimostrazioni videoregistrate.

- L'intervento prodotto ha consentito un miglioramento del controllo glico-metabolico (da 8,7 +/-2,3% a 7,8 +/- 2,0% P= 0,01).

- Sono state create le premesse per un bollettino dedicato a questi pazienti, di rinforzo all'educazione diabetologica impartita, da distribuire al momento della visita di controllo.

L'indagine ha consentito di conoscere in dettaglio la situazione epidemiologica della popolazione extracomunitaria diabetica dell'ULSS n° 5 Ovest Vicentino.

E' stato allestito un archivio informatico di tutti questi pazienti regolarmente afferenti al Servizio Diabetologico dell'ULSS.

Il fatto che la percentuale di diabetici nella popolazione di extracomunitari sia inferiore a quella disunibile dalla loro presenza rispetto alla popolazione generale dell'ULSS può dipendere sia da una età modicamente giovane di questi extracomunitari che da una minor afferenza al Servizio Diabetologico da parte loro. Tale seconda possibilità merita ulteriori accertamenti trattandosi di una fascia particolarmente debole. Questa ricerca dimostra che con strumenti relativamente semplici si possono ottenere buoni risultati in termini di miglior controllo della malattia diabetica; ciò suggerisce che cattivi risultati ottenuti in questa fascia debole senza intervento specifico sono legati a difficoltà contingenti di carattere pratico e a barriere socio-culturali che necessitano, per poter essere superate, di una particolare attenzione e impegno. La principale ricaduta per il Servizio Sanitario Regionale consiste nel suggerimento offerto da questi risultati di predisporre a livello centrale sussidi didattico-informativi relativamente semplici quali: opuscoli multilingua e video-registrazioni da distribuirsi ai centri periferici. Ciò ovviamente potrebbe essere esteso al di là dell'ambito diabetologico, in qualsiasi settore ove una maggior comprensione della malattia e della terapia possa portare ad una minor morbilità ed una minor percentuale di complicanze, destinate certamente a un benefico ritorno in ambito Sanitario ed Economico.

- 1- Si segnala una certa difficoltà incontrata a livello locale per la pronta utilizzazione delle risorse economiche messe a disposizione che si è tradotta in un rallentamento dei tempi della ricerca.
- 2- Rispetto al progetto iniziale, come già indicato nel "rapporto sulla progressione della ricerca" stilato il 27.06.01, la notevole sproporzione tra il finanziamento richiesto e l'importo concesso non ha consentito di svolgere il progetto nella sua completezza.
- 3- Pur limitato ai soli extracomunitari diabetici il finanziamento concesso non ha consentito la produzione del materiale didattico-illustrativo multilingua che era uno degli obiettivi della ricerca.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 904/04/99

Responsabile Scientifico D'Amico Davide - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Fegato omologo o eterologo isolato e perfuso "a sistema aperto" per il supporto metabolico alla insufficienza epatica acuta”.

L'insorgenza di *fulminant hepatic failure* (FHF) o di uno scompenso epatico acuto su epatopatia cronica rappresenta a tutt'oggi una condizione clinica severa, gravata da mortalità rilevante, compresa tra 50% e 80% secondo i più recenti dati riportati in letteratura.

L'assenza di un supporto artificiale o bio-artificiale efficace alla funzione epatica impone il ricorso ad un trapianto di fegato emergente nei casi di FHF in cui si assista ad una progressione di decadimento neurologico.

Il presente studio si è proposto l'obiettivo di testare l'efficacia di un nuovo modello sperimentale porcino di fegato isolato e perfuso con “sistema aperto” dopo ottenimento di uno stato di anepatia nell'animale. Il fegato proveniente da un animale donatore viene posto in un sistema di perfusione continua connesso all'animale su cui è stata indotta la FHF.

Il supporto metabolico così allestito ci ha permesso di poter fornire un'assistenza epatica autonoma fino alla 6^a ora. Solo in un caso si sono verificate alterazioni emodinamiche tali da condurre a morte l'animale dopo 4 ore. Viceversa in tutti gli altri casi l'exitus è stato causato da un aumento della concentrazione dei lattati (grafico 1) che hanno determinato una condizione di acidosi metabolica con decesso dell'animale intorno alla 6^a ora. Durante l'assistenza si è proceduto al monitoraggio biochimico mediante prelievi ematici ogni 60 minuti finalizzati alla determinazione degli indici di citolisi, colestasi, sintesi epatica, etc.

I parametri di funzionalità epatica hanno dimostrato, un progressivo scadimento dell'attività metabolica a partire dalla 4^a ora.

In particolare l'animale tende verso uno stato di acidosi lattica, che peraltro risulta essere attualmente la causa principale di morte, dopo 4-6 ore di perfusione.

Si è, inoltre, evidenziato un contestuale aumento degli indici di citolisi ed in particolare delle AST (grafico 2)

Alla lettura cito-istologica si sono osservati, durante la prima ora di perfusione, infiltrati granulocitari endosinusoidali di entità variabile, ma per lo più scarsa.

Questa prima fase di studio ci ha permesso di ottenere un buon controllo emodinamico del sistema, una valida omeostasi perfusoria del fegato ed una sufficiente ematosi dello stesso in assenza di potenziali eventi avversi legati

alla perfusione extracorporea quali emolisi, piastrinopenia o altre complicanze quali embolia gassosa, CID, emorragia, etc.

I risultati ad oggi ottenuti possono, pertanto, ritenersi soddisfacenti dal punto di vista del controllo della stabilità emodinamica del sistema.

Meno incoraggianti, invece, e di non facile interpretazione fisiopatologia i risultati ottenuti sul piano metabolico e, probabilmente imputabili alla difficoltà di ottenere una corretta ematosi del perfusato epatico, come descritto in letteratura.

In questa direzione, pertanto, si è rivolta la nostra attenzione con l'impiego di varie soluzioni (ossigenatori, cannulazione dell'arteria epatica) che ci hanno permesso di fornire elevate tensioni di ossigeno nel sangue perfusato con l'intento di regolarne le pressioni parziali di O₂ e CO₂.

I parziali risultati ad oggi ottenuti suggeriscono possibili e promettenti sviluppi futuri nella realizzazione di un sistema complesso di assistenza extracorporea nella combinazione xenogenica epatica maiale-uomo.

Grafico 1. Misurazione di PT(%), Bil tot (umol/L), Lattati

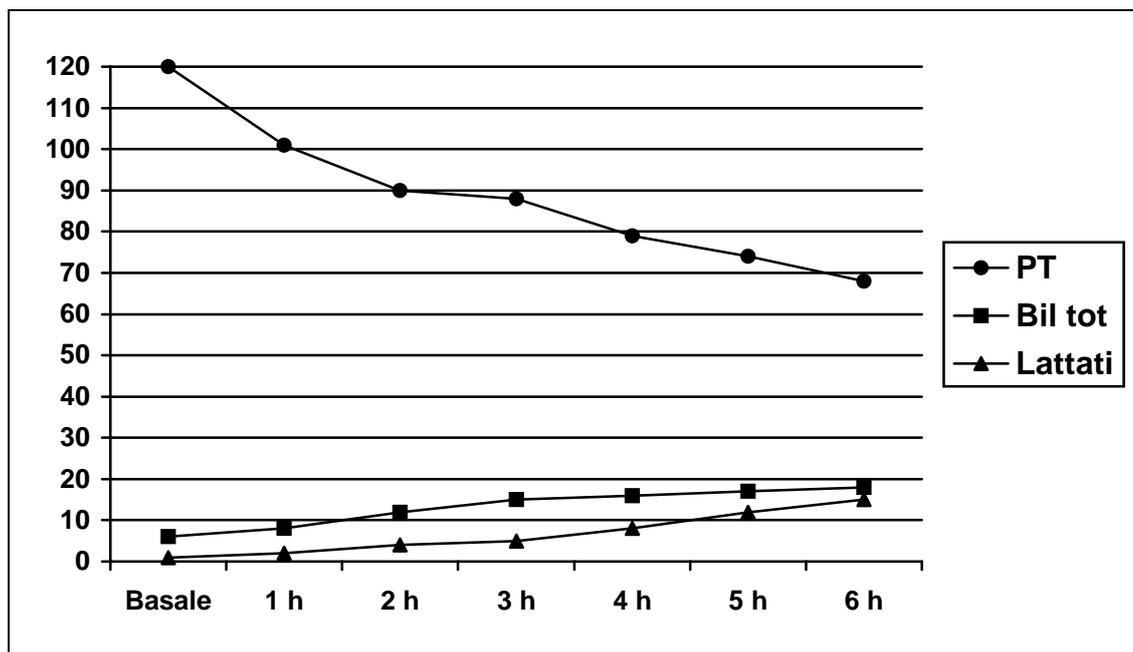
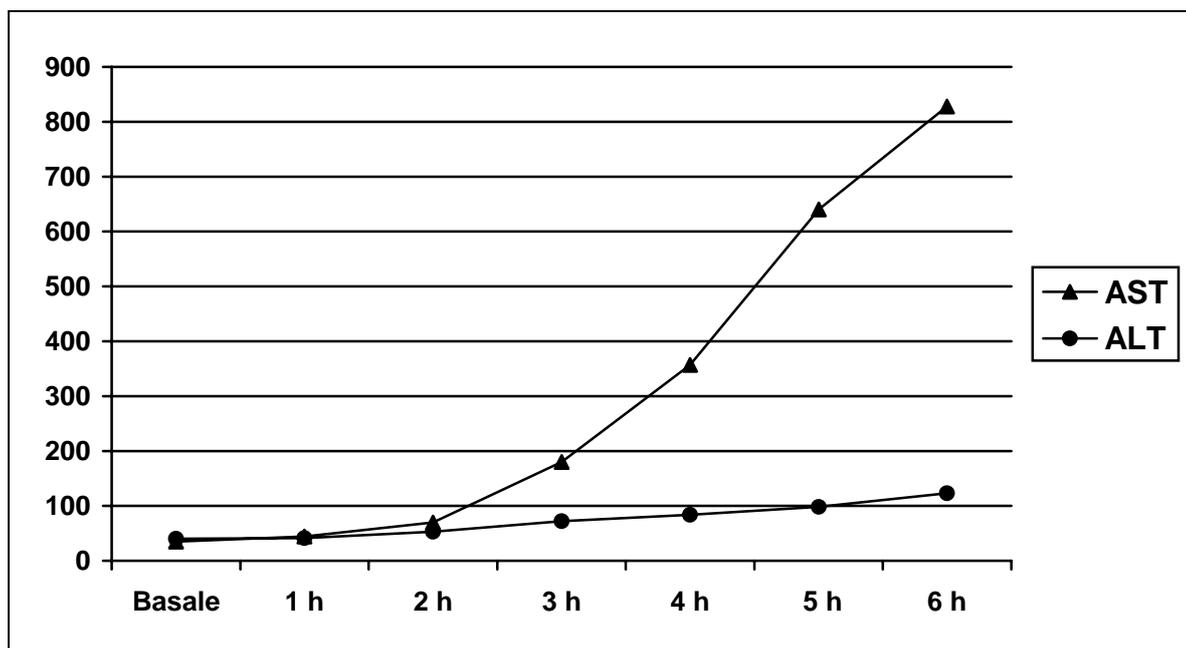


Grafico 2. Comparazione di AST/ALT (UI)



SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 905/01/99

Responsabile Scientifico Daliento Luciano - Ente Proponente Università di Padova

“Sopravvivenza, morbilità e qualità di vita delle cardiopatie congenite operate: istituzione di un registro clinico nella Regione Veneto”.

Relazione del primo anno di attività del gruppo di ricerca finalizzata

Nel primo anno di attività il progetto si è sviluppato in varie direzioni:

1) Si è lavorato prevalentemente nella definizione delle metodologie del follow-up, contribuendo attivamente alla stesura di linee Guida Internazionali prima coordinate dal prof G. Webb dell'Università di Toronto "Consensus Conference on Adult Congenital Heart Disease" e la seconda coordinata dal prof. L Deanfield del Royal College di Londra per conto della European Society of Cardiology "Task force on Grown-up Heart disease", entrambe di prossima pubblicazione.

Attraverso questo lavoro sono stati identificati i percorsi diagnostici più idonei per un follow-up programmato, specifico per ciascun tipo di cardiopatia e di intervento chirurgico correttivo o palliativo, strumento idoneo ed efficace per la valutazione della morbilità e qualità di vita dei cardiopatici congeniti operati e divenuti adulti.

Si è inoltre contribuito alla formulazione e descrizione dei "Criteri di Valutazione della capacità lavorativa, idoneità al lavoro specifico, attitudine ad attività fisica sportiva ed assicurabilità nel cardiopatico congenito", linee guida elaborate per conto della Società Italiana di Cardiologia Pediatrica.

Si è attivata inoltre una collaborazione con un gruppo di Neurofisiologi (dr.ssa Mappelli) per la formulazione di tests di valutazione delle capacità cognitive in soggetti che sono stati a lungo ipossici perché cianotici e hanno subito interventi cardiocirurgici in circolazione extracorporea.

2) Il lavoro clinico per la istituzione di un Registro si è indirizzato prevalentemente su due specifiche popolazioni:

a) Si è rivista la casistica dei pazienti operati presso la Cardiocirurgia dell'Università di Padova negli ultimi 10 anni che avevano al momento dell'intervento un'età superiore ai 18 anni, con l'intento di valutare i risultati a breve e a lungo termine, in confronto ai pazienti che hanno ricevuto la correzione precocemente. Più specificamente sono stati archiviati i dati di 263 pazienti operati per cardiopatie semplici e complesse tra il gennaio del 1990 e l'agosto del 2000. Si sono rilevati la mortalità precoce e tardiva, le condizioni cliniche e lo stato funzionale, espresso in gradi di Ability Index all'ultimo follow-up. Questa popolazione è stata inserita in un follow-up programmato secondo quanto previsto dalle linee guida che abbiamo contribuito a determinare.

I risultati di questo lavoro sono stati presentati nel settembre 2001 a Lisbona al Congresso Internazionale dell'European Association Cardiothoracic Surgery e ad Ancona nel corso del Congresso Nazionale della Società Italiana di Cardiologia Pediatrica.

b) Si è proceduto alla raccolta dei dati dei pazienti operati di correzione radicale di un difetto del setto atrioventricolare (canale parziale o completo), operati dal 1975 ad oggi

Trattasi complessivamente di 462 pazienti: di essi si sta procedendo alla tabulazione dei dati riguardanti lo stato preoperatorio, i dati relativi alla correzione chirurgica, l'esito perioperatorio e la mortalità a distanza, lo stato clinico all'ultimo follow-up. Relativamente ai pazienti operati dal 1985, pari a 119 soggetti sono stati analizzati più compiutamente i dati pre e postoperatori per confrontarli con i risultati dei pazienti con la stessa patologia operati più tardivamente. I risultati di questa parte del progetto sono stati presentati all'EACTS/ESTS Joint Meeting nel settembre 2001 a Lisbona.

e) Si sono iniziati ad inserire nel Registro i pazienti operati di correzione radicale di tetralogia di Fallot. Più specificamente in regime di day-hospital o di ambulatorio protetto, si è proceduto alla stratificazione del rischio aritmico e alla valutazione funzionale di 70 pazienti operati di correzione radicale con un più lungo follow-up postoperatorio e pertanto più a rischio di eventi gravi come la disfunzione del ventricolo destro e la morte improvvisa. Oltre all'esame clinico si è proceduto all'esecuzione di un elettrocardiogramma di superficie in condizioni basali per la misurazione della durata del QRS e della dispersione spaziale e temporale dell'intervallo QT, di una registrazione dell'elettrocardiogramma delle 24 ore secondo Holter per la evidenziazione di eventuali aritmie e per la misurazione della variabilità della frequenza cardiaca, della registrazione di un elettrocardiogramma amplificato per la evidenziazione di eventuali potenziali tardivi, di un ecocardiogramma color doppler per la valutazione qualitativa e quantitativa dell'efflusso ventricolare destro, della funzione ventricolare e dell'entità della insufficienza polmonare residua. In tal maniera sono stati identificati due pazienti che necessitavano di reintervento per inserzione di homograft a livello dell'efflusso destro e di un paziente a rischio di morte improvvisa per ripetuti episodi di tachicardia ventricolare sostenuta al quale è stato inserito un cardiovertitore permanente. Questa parte della ricerca ha confermato la validità della QT dispersione e del volume telediastolico del ventricolo destro come fattori altamente predittivi di grave instabilità elettrica ventricolare.

d) Per la parte del progetto che riguarda la formazione ed i rapporti con i cardiologi del territorio, si è accentuata la disponibilità di consulenza riguardo i cardiopatici congeniti adulti, con particolare riferimento ai pazienti che volevano affrontare una gravidanza (sono state direttamente seguite e portate a buon esito 3 gravidanze ad alto rischio), ed ai pazienti con reazione di Eisenmenger.

RELAZIONE CONCLUSIVA DEL GRUPPO DI RICERCA FINALIZZATA

In questo secondo anno di attività si sono sviluppati i temi oggetto del progetto. In particolare si è creato un data base in ACCESS contenente i dati anagrafici e clinici (tipo di cardiopatia, tempo e modalità di correzione chirurgica, stato attuale/follow-up clinico strumentale) di 730 pazienti cardiopatici congeniti che sono afferenti alla Cardiologia, alla Pediatria e alla Cardiochirurgia dell'Università di Padova. Trattasi prevalentemente di soggetti con un difetto del setto atrioventricolare o affetti da tetralogia di Fallot, operati tra il 1975 ed il 2000.

Dei 462 pazienti operati per un difetto del setto atrioventricolare sono stati più dettagliatamente studiati 119 pazienti operati dal 1990 al 2000. 19 pazienti (16%) sono deceduti. I rimanenti 100 sono stati visti ambulatorialmente e i dati clinici e strumentali sono stati inseriti nel nostro database: il 93% ha un Ability Index 1 ed il 7% un Ability Index 2; il 60% presenta una insufficienza della valvola atrioventricolare di sinistra lieve, un 7% una insufficienza moderata. 9 pazienti (7%) sono stati sottoposti a reintervento precoce per shunt residuo e 14 (11%) per insufficienza della valvola atrioventricolare sinistra.

Sono stati inseriti i dati anagrafici e chirurgici di 268 pazienti operati di correzione radicale di Fallot dal 1975 al 1990. 23 pazienti (8%) sono deceduti. 101 pazienti sono stati contattati telefonicamente e 80 sono stati esaminati dettagliatamente mediante ambulatorio integrato. Più del 90% di questa popolazione presenta un Ability Index eguale ad 1.11 target principale del nostro studio dei pazienti operati di correzione radicale di Fallot è stato quello di sperimentare nuovi indici capaci di ottimizzare la stratificazione del rischio aritmico e di verificare il timing di reintervento nei casi in cui l'insufficienza polmonare residua al primo intervento di correzione radicale era una concausa della disfunzione ventricolare e dell'instabilità elettrica. Riguardo alla stratificazione del rischio aritmico è risultato determinante non tanto il valore assoluto dalla durata del QRS, quanto piuttosto la variazione che questo parametro presenta durante il follow-up, soprattutto se essa si accompagna ad un concomitante aumento del volume telediastolico del ventricolo destro. La variazione nel tempo della durata del QRS amplificato si correla in maniera significativa con un aggravamento della instabilità elettrica ventricolare. Si è proceduto all'approfondimento del ruolo del sistema autonomo nella definizione della instabilità elettrica, verificando tramite l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca su registrazioni elettrocardiografiche delle 24 ore secondo Holter, quali sono state le modificazioni nel tempo (rivalutazione dopo un periodo medio di 5 anni), soprattutto in relazione al cambiamento dello stato elettrico ventricolare. Le alterazioni del sistema neurovegetativo in questo secondo rilevamento a distanza appaiono correlate alla funzione ventricolare. Sulla stessa popolazione di pazienti considerati al follow-up si è proceduto alla determinazione delle funzioni cognitive, applicando il protocollo messo appunto nel primo anno di questo studio e che comprende una serie di tests specifici per lo studio delle funzioni cognitive integrati da un colloquio psicologico e da un questionario per la definizione della qualità di vita. Pur trovando un normale quoziente intellettivo (QI) e non deficienze significative nel livello di scolarizzazione l'indagine ha messo in evidenza alcuni deficit cognitivi soprattutto nell'ambito del mental control e dell'executive planning (35% in the Tower of London test) e nell'abilità di calcolo (17%, acalculia test). Nel data base è stato costituito un gruppo di pazienti con cardiopatie congenite varie che al momento dell'intervento presentavano un'età superiore ai 18 anni, con l'intento di valutare i risultati a breve e a lungo termine

2) Per la parte del progetto che riguardava la formazione ed i rapporti con i cardiologi del territorio si è lavorato attivamente nell'ambito delle task force per la formulazione di linee guida per lo studio del Cardiopatico Congenito Adulto, istituite dalla Società Canadese di Cardiologia e dalla Società Europea di Cardiologia. E' stato inoltre organizzato un Corso di Cardiologia Pediatrica con particolare attenzione ai risultati a distanza degli operati di tetralogia di Fallot, trasposizione dei grandi vasi e di tronco arterioso comune. Il coordinatore della ricerca ha inoltre tenuto un seminario di 3 giorni presso la Scuola di Specializzazione di Cardiologia dell'Università di Palermo sui cardiopatici congeniti adulti.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 909/06/99

Responsabile Scientifico Di Mario Francesco - Ente Proponente Università di Padova

“Accesso all'endoscopia gastrica e diagnosi di carcinoma dello stomaco nel Veneto nel decennio 1990-1999: valutazione del rapporto costo-beneficio, assunta come indicatore di efficacia la evidenza di anticipo diagnostico”.

Rispetto alle linee di ricerca formulate in fase d'impostazione dello studio si sono ottenuti i seguenti risultati: 1) verifica della frequenza di lesioni a significato pre-neoplastico in confronto a patologie benigne a carico della mucosa gastrica e duodenale mediante la raccolta dei referti endoscopici relativi a 10 anni consecutivi in due differenti zone d'Italia: Padova e Parma. Si tratta di due aree nelle quali esiste un Centro Endoscopico di Riferimento per l'intera area urbana (Ospedale Busonera/Ambulatori di Gastroenterologia a Padova e Ospedale Maggiore/Ambulatori di Gastroenterologia a Parma). Nelle due città esiste una fondamentale differenza in termini di sensibilizzazione dei Medici di Medicina Generale e alla problematica dell'infezione da *Helicobacter pylori* ed ai suoi rapporti con il cancro gastrico, essendo stata svolta a Padova fin dalla fine degli anni '80 una capillare opera d'informazione sull'argomento, contrariamente a quanto è avvenuto a Parma. I risultati ottenuti esaminando la frequenza di ulcera gastrica e duodenale nelle due città negli ultimi 10 anni hanno rivelato interessanti differenze tra le due realtà, come riassunto nelle tabelle e figure allegate (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Le principali differenze si possono così riassumere:

A) la frequenza di ulcera duodenale ritenuta correlata all'infezione da *Helicobacter pylori* in oltre il 90 % dei casi appare quasi doppia nella casistica di Parma rispetto a quella di Padova mostrando oggettivamente l'importanza dell'informazione al livello della Medicina Generale circa l'importanza di eradicare l'infezione nei soggetti ulcerosi come suggerito fin dal 1994 dal Ministero della salute per ottenere la guarigione dell'ulcera.

B) la frequenza di ulcera gastrica potenzialmente a rischio di sviluppo di neoplasia gastrica pur essendo inferiore nella casistica di Padova mostra comunque una tendenza alla stazionarietà negli anni, a dimostrazione dell'importanza per tale patologia di altri fattori quali l'utilizzo di farmaci antinfiammatori.

Venendo poi alla riconosciuta più importante lesione precancerosa gastrica la displasia epiteliale dello stomaco (ora più correttamente indicata come neoplasia gastrica non invasiva) si è potuto concretizzare su una casistica di 118 pazienti diagnosticati consecutivamente in 14 centri di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva del Veneto un follow-up endoscopico biotico di 37 mesi in media con un range di 12-19 mesi, che rappresenta il più lungo follow-up su tale patologia. La ricerca finalizzata ha permesso di riunire gastroenterologi, endoscopisti e patologi operanti in questi diversi centri in un tavolo ideale, unificando i criteri di classificazione non solo per l'identificazione della lesione ma anche per graduarne la severità. Ciò è tanto più importante perché significa per un paziente portatore della precancerosi di iniziare un follow-up endoscopico biotico con frequenza mensile trimestrale semestrale o annuale a secondo della gravità della lesione, con conseguente carico di lavoro per le strutture coinvolte e costi conseguenti. Lo studio, infatti, ha potuto stabilire come la displasia epiteliale anche di grado lieve sia collegata all'evoluzione in neoplasia con conseguente necessità di un monitoraggio nel tempo (8 casi su 90). Per quanto riguarda la displasia severa, l'evoluzione a carcinoma è stata dimostrata in 11 casi su 16, suggerendo la necessità di procedere per questi pazienti alla estirpazione del focolaio neoplastico con tecnica chirurgica o con metodologia endoscopica di ablazione (mucosectomia). Un altro importante risultato della ricerca è rappresentato dall'evidenza che un monitoraggio accurato di tale lesione precancerosa permette di scoprire il carcinoma gastrico in fase precoce (75% dei casi) con ovvie implicazioni sulla prognosi per i pazienti. Infine, la ricerca ha permesso di puntualizzare l'importanza dell'eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori* nei pazienti portatori di displasia con un abbassamento significativo della progressione verso la neoplasia nei pazienti eradicati in confronto ai non eradicati. I risultati complessivi della ricerca sono stati inviati per pubblicazione su una delle più importanti riviste europee di gastroenterologia, "GUT", pubblicata in Gran Bretagna, con la doverosa specificità del contributo della Regione Veneto.

Un altro degli scopi della ricerca finalizzata è stato di ricercare possibili fattori di rischio per lo sviluppo dell'adenocarcinoma dello stomaco con metodiche semplici non invasive e poco costose. Si sono individuati a tal fine soggetti con familiarità di I grado per adenocarcinoma gastrico, per lo più asintomatici i quali sono stati sottoposti a prelievo di sangue per la determinazione dei livelli di pepsinogeni sierici, indici sia di funzione gastrica sia dell'integrità della mucosa dello stomaco, tanto da essere definiti da autori anglosassoni "serological biopsy of gastric mucosa". La determinazione dei pepsinogeni è stata compiuta su 25 soggetti positivi per infezione da *Helicobacter pylori* con familiarità positiva in confronto ad analogo numero di pazienti dispeptici portatori dell'infezione ma senza familiarità per neoplasia. I dosaggi effettuati hanno permesso di evidenziare una significativa differenza tra i livelli sia del pepsinogeno I e del pepsinogeno II nel gruppo dei pazienti con familiarità rispetto ai controlli. Tale dato suggerisce la possibilità che anche in assenza di sintomatologia siano presenti in tali soggetti alterazioni atrofiche della mucosa gastrica possibilmente suscettibili di evoluzione in senso neoplastico. A parziale riscontro di ciò in alcuni soggetti sottoposti in tale gruppo ad endoscopia digestiva con biopsie della mucosa gastrica è stato possibile dimostrare una pangastrite atrofica severa con metaplasie intestinale. Su tali basi è pertanto possibile prevedere la pianificazione di studi di prevenzione della neoplasia gastrica in soggetti a rischio mediante l'utilizzo di test non invasivi come il dosaggio dei pepsinogeni sierici. I risultati di questa parte della ricerca sono stati inviati ad una rivista europea di riferimento "Scandinavian Journal

of Gastroenterology" pubblicata ad Oslo con la doverosa specificità del contributo della Regione Veneto. In conclusione quindi, la ricerca finalizzata ha permesso di stabilire i seguenti punti:

- 1) La sensibilizzazione dei medici di Medicina Generale alla eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori* porta ad una significativa riduzione del numero di ulcere dimostrate endoscopicamente;
- 2) La displasia epiteliale gastrica va riconosciuta come lesione precancerosa anche in stadio lieve e sottoposta ad adeguato monitoraggio endoscopico biptico;
- 3) La displasia severa è da riguardare come una neoplasia gastrica a tutti gli effetti e costituisce un'indicazione precisa alla sua asportazione
- 4) Un follow-up adeguato della displasia si accompagna all'individuazione di cancro gastrico in fase precoce in 3/4 dei casi;
- 5) L'eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori* nei soggetti con displasia porta ad una riduzione della progressione di tale lesione;
- 6) I soggetti con familiarità di I grado per adenocarcinoma dello stomaco presentano livelli di pepsinogeni sierici significativamente diminuiti, suggerendo l'opportunità di utilizzare questa metodica non invasiva per individuare i soggetti a rischio di presentare gastrite atrofica e metaplasia intestinale.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 912/03/99

Responsabile Scientifico Doglioni Claudio - Ente Proponente ULSS 1 di Belluno

“Citotossicità cellulare mediata nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino”.

Le malattie infiammatorie croniche intestinali, la Malattia di Crohn (MC) e la retto-colite ulcerosa (RCU), sono verosimilmente causate da una abnorme risposta immune, condizionata da un particolare background genetico, ad antigeni sconosciuti. Numerose cellule infiammatorie ed immunitarie sono coinvolte in entrambi le forme di malattia infiammatoria cronica intestinale. E' particolarmente complesso identificare i principali meccanismi patogenetici coinvolti nelle fasi iniziali e di riacutizzazione di queste malattie. Si ritiene che i più importanti fenomeni infiammatori della MC siano cellule mediati da linfociti T con pattern Th1 di produzione citochinica, mentre la RCU vedrebbe prevalere una risposta umorale controllata da linfociti con pattern Th2.

La citotossicità cellulare vede linfociti T CD3+/CD8+ e cellule NK quali principali effettori della risposta Th1.

L'azione citotossica è principalmente mediata dal sistema granzima/perforina. La perforina provoca la formazione di pori nella cellula bersaglio, facilitando l'entrata di granzima, ed in particolare il granzima B, facente parte di una famiglia di serin-proteasi, in grado di intaccare il DNA ed indurre apoptosi.

L'identificazione della presenza, del numero e della localizzazione di linfociti T ed NK con funzioni citotossiche può aiutare nella identificazione dei meccanismi patogenetici di queste malattie; questi dati possono inoltre, fornire, se differenzialmente espressi rispetto ad altre forme di patologia intestinale, supporto diagnostico ed indicazioni sull'efficacia di specifiche terapie.

Studio delle molecole di citotossicità nelle malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Lo studio è stato condotto su di un primo gruppo di pazienti afferenti al Servizio di Endoscopia Digestiva ed alla Divisione di Chirurgia dell'Ospedale San Martino di Belluno e su di una seconda serie di pazienti studiati presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Ospedale Cervello di Palermo. Il primo gruppo consisteva di:

- 21 casi di RCU di cui erano disponibili campioni biptici sia all'esordio di malattia, sia durante il follow-up; di 3 di questi casi erano disponibili dei resecati chirurgici di grosso intestino per complicazioni della malattia
- 15 casi di MC: di questi 10 erano resezioni di ileo per malattia stenotomica o perforata e 5 casi biptici seguiti presso il Servizio di Endoscopia digestiva con prelievi multipli a diversi intervalli di tempo.

Il secondo gruppo, proveniente dall'Ospedale Cervello di Palermo era costituito da:

10 casi di MC, con resezione chirurgica

10 casi di RCU, con resezione chirurgica prevalentemente per megacolon tossico.

E' stata inoltre utilizzata una serie (N°10 casi) di controlli di mucosa morfologicamente normale, prelevata da campioni chirurgici di ileo e di grosso intestino asportati per neoplasia o per diverticolosi.

I casi, sia biptici che chirurgici sono stati valutati sia morfologicamente, sia con immunofenotipo per definire la composizione dell'infiltrato linfocitario con una serie di marcatori generici -CD3, CD20, CD4, CD8, CD56- e successivamente caratterizzati per l'espressione di molecole di citotossicità quali: Granzima B, Perforina, TIA1. In alcuni casi sono stati effettuati esperimenti di colocalizzazione di GranzimaB e CD8 e perforina e CD8 per dimostrarne la coespressione nelle stesse cellule.

E' stata inoltre valutata la percentuale di cellule dell'epitelio intestinale con fenomeni di apoptosi, tramite tecnica TUNEL. In otto casi biopsici (4 MC e 4 RC) in cui erano disponibili tessuti congelati con RNA di adeguata qualità, l'espressione di Granzima B è stata valutata anche con tecnica RT-PCR, utilizzando la GAPDH come standard interno.

Nella mucosa normale sia dell'ileo che del colon vi erano solo rarissime cellule esprimenti granzima B e perforina, riferibili essenzialmente a cellule NK (CD56+); praticamente non vi erano cellule CD3+, CD8+ che esprimessero molecole di citotossicità. Nei campioni di RCU, cellule linfoidi granzima B+, perforina +, erano evidenziabili nella lamina propria attorno alle aree di ascesso criptico, ma il loro numero complessivo era relativamente basso. Questo pattern di distribuzione era presente nello stesso paziente nei diversi campioni temporali e correlava con il grado di attività della malattia; elementi granzima B+ e/o perforina+ erano praticamente assenti nelle fasi di quiescenza della malattia. Questi dati correlavano inoltre con il basso livello di mRNA per granzima B individuato nei campioni di RCU analizzati, simile a quello di campioni normali. Un significativo incremento di linfociti CD8+, granzimaB+, non solo localizzati attorno agli ascessi criptici, era presente nei campioni di RCU sottoposti a resezione per megacolon tossico.

Nella MC gli elementi granzima B+ e perforina+ erano invece frequenti nelle lesioni focali della lamina propria. Quasi tutte le cellule granzima B+ erano CD3+ e CD8+. Frequentemente si sono osservati granuli granzima B+ di grosse dimensioni, spesso ad un polo della cellula, caratteristici di elementi citotossici attivati.

Nella MC vi era inoltre una positiva correlazione con l'espressione di granzima B mRNA, con livelli significativamente superiore ai controlli normali (5x) ed alla RCU.

Con metodica TUNEL per la marcatura di elementi apoptotici, sono stati valutati gli stessi campioni. Nella mucosa normale vi erano solo occasionali elementi TUNEL + nelle cripte e nell'epitelio di superficie oltre che nella lamina propria. Nella RCU gli elementi TUNEL+ erano riferibili principalmente a granulociti negli ascessi criptici e nella adiacente lamina propria; tuttavia il numero di cellule TUNEL+ era solo lievemente aumentato. In contrasto, nella MC, era osservabile un elevato numero di cellule TUNEL+ in sede pericriptica, nelle lesioni infiammatorie ed anche in elementi mononucleari nella lamina propria. La proporzione di cellule TUNEL+ e granzima B+ erano significativamente aumentati nella mucosa di pazienti con MC rispetto ai controlli normali ed ai pazienti con RCU.

Questo studio identifica *in situ* il meccanismo effettore tramite molecole di citotossicità quale uno dei principali meccanismi patogenetici nella MC: non solo il numero di cellule linfoidi granzima B+/perforina+ è significativamente aumentato nella malattia di Crohn rispetto alla RCU, ma anche il probabile effetto di tale meccanismo, l'innescamento di processi apoptotici evidenziabili tramite la tecnica TUNEL, è particolarmente importante nella MC rispetto alla RCU.

Questi dati non sono solo utili ad investigare un meccanismo patogenetico, ma possono avere ricadute pratiche, come ausilio nella diagnosi differenziale fra MC ed RCU, problema non trascurabile dal punto di vista istopatologico, per la quantificazione del grado di attività della MC, per valutare l'efficacia terapeutica anche in vista dell'impiego di farmaci biologici quali anticorpi diretti contro molecole che innescano i meccanismi di citotossicità.

La recente identificazione di fattori di trascrizione specifici, utilizzabili per la caratterizzazione *in situ* di linfociti Th1 ci consentirà di arricchire questo studio con una ulteriore informazione di possibile valore patogenetico e diagnostico.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 914/02/99

Responsabile Scientifico Fede Antonella - Ente Proponente ULSS 16 di Padova

“La riabilitazione vocale mediante protesi tracneo esofagea dopo laringectomia totale”

La riabilitazione fonatoria del laringectomizzato rappresenta un problema di difficile soluzione sia per il chirurgo O.R.L. sia per il foniatra. La voce esofagea, il laringofono, le tecniche chirurgiche ricostruttive sono utilizzate per la riabilitazione tuttavia ognuno di questi metodi presenta limiti importanti con una qualità della voce che non si avvicina minimamente al meccanismo pneumo-fonatorio fisiologico. Negli ultimi anni sono stati riportati risultati favorevoli utilizzando valvole ad una via inserite in una fistola tracheo-esofagea che permette al paziente, utilizzando aria polmonare, un eloquio pressoché normale. Tale semplice metodica con il posizionamento di una protesi ad una via inserita nella fistola permette di ovviare il problema dell'aspirazione di liquidi in trachea e consente di ottenere risultati soddisfacenti confermati dalla Letteratura mondiale.

L'aria polmonare, convogliata in esofago attraverso la fistola fonatoria, permette l'attivazione di un segmento vibrante a livello dell'esofago cervicale atto a produrre un suono che viene modulato dalle strutture sovraglottiche (cavità orale, fosse nasali, denti, labbra).

Scopo della ricerca, eseguita presso l'Ospedale S. Antonio di Padova (U.L.S.S. 16 U.O.Agg. di O.R.L.) e la Divisione Clinicizzata di O.R.L. dell'Ospedale di Treviso (U.L.S.S. 9) è stato quello di raccogliere i dati riguardanti l'allestimento della fistola, valutare la migliore qualità ed efficienza del programma terapeutico e riabilitativo, migliorare la qualità della vita del paziente laringectomizzato con conseguente minor onere socio-sanitario.

Dal novembre 1999 all'agosto 2002 sono stati reclutati allo studio 146 pazienti che possedevano i requisiti richiesti per l'ammissione. Tutti i pazienti avevano una forte motivazione ad apprendere il metodo di comunicazione verbale e presentavano un'integrità fisico-intellettuale. Sono stati tutti sottoposti a test di autoinsufflazione risultato positivo (veicolare aria polmonare in esofago tramite un sondino transnasale collegato al tracheostoma da un anello adesivo alla cute), avevano un tracheostoma di almeno 2 cm ed il trattamento radiante postoperatorio era terminato da almeno sei mesi.

122 pazienti sottoposti ad allestimento primario della fistola tracheo-esofagea con posizionamento di protesi fonatoria cioè in corso di intervento di laringectomia totale;

24 pazienti sono stati sottoposti ad allestimento secondario della fistola tracheo-esofagea con posizionamento di protesi fonatoria in anestesia generale sotto guida endoscopica.

Le protesi impiantate sono state:

95 (65,1%) casi tipo Provox 1

33 (22,6%) casi tipo Blum Singer Inwelling

18 (12,3 %) casi tipo Blum-Singer tradizionali o Groningen

La durata media delle protesi è stata di 7,5 mesi. Complessivamente sono state utilizzate 319 protesi.

In 130/ 146 (89%) pazienti è stato riscontrato un buon uso del dispositivo protesico con un buon risultato fonatorio.

La rieducazione logopedica è stata eseguita in tempi minori rispetto alle altre metodiche, in particolare rispetto all'apprendimento della voce esofagea. Il programma riabilitativo è stato efficiente permettendo un eloquio pressochè normale. La migliore qualità di vita ha permesso un più rapido adattamento psico-sociale. In alcuni casi, in particolare nei soggetti più giovani, ha permesso perfino un reinserimento lavorativo con minor onere per il Servizio Socio-Sanitario Regionale.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 915/06/99

Responsabile Scientifico Filippi Mauro - Ente Proponente ULSS 10 di San Donà del Piave

“Processi di provata efficacia e relativi indicatori per il buon funzionamento dei servizi infermieristici”.

Nell'evoluzione della professione infermieristica, l'attuale momento storico rivela un insieme di fattori che, sebbene presenti in modo ancora attenuato e limitatamente ad alcune realtà, rappresentano i primi segnali di una professione in fermento. Alcuni dei succitati fattori possono essere rappresentati da:

- consolidamento del processo di professionalizzazione degli infermieri
- maggior consapevolezza del nursing come disciplina;
- rilevanza/autonomia attribuita ai processi assistenziali nell'erogazione di prestazioni sanitarie,
- introduzione della ridefinizione delle funzioni e delle responsabilità in ambito assistenziale e professionale;
- introduzione dei corsi di laurea universitari.

Tali elementi si sono, quindi, in anni recenti concretizzati in progressi organizzativi quali:

- la diffusione nelle strutture sanitarie del Servizio dell'Assistenza Infermieristica, che si è nel tempo caratterizzato quale tipico organo di supporto all'attività assistenziale,
- la nascita di veri e propri Dipartimenti dell'assistenza, da intendersi quali evoluzione organizzativa, gestionale e professionale dei Servizi dell'Assistenza verso configurazioni in unità organizzative responsabili, chiamate alla gestione diretta del processo di nursing e degli operatori ad esso deputati,
- infine, la possibilità di attribuire l'incarico di dirigente ai responsabili dei Servizi/ Dipartimenti.

Al di là dei diversi stadi evolutivi che caratterizzano i singoli contesti e del grado di dinamicità degli stessi è improcrastinabile l'esigenza di focalizzare gli sforzi sul generale ripensamento dell'organizzazione dell'attività assistenziale ed in particolare sul livello qualitativo della stessa, che dovrebbe sempre più orientarsi a ricercare un equilibrio tra le funzioni attuate da un numero elevato di professionisti (appartenenti a gruppi professionali diversi), al fine di migliorare i servizi erogati, le condizioni di lavoro, il funzionamento delle unità operative ed il clima relazionale tra gli operatori.

Ecco che allora emerge in modo sempre più evidente la necessità di creare sistemi e strumenti di governo della professione infermieristica e di introdurre modalità atte a verificare la qualità della professionalità medesima.

Da queste prime considerazioni trae origine il presente lavoro che è chiamato a supportare le esigenze di diversi interlocutori: da un lato la regione che a capo di un gruppo di aziende sanitarie è costantemente alla ricerca di strumenti di indirizzo e di governo volti a garantire il soddisfacimento dei bisogni sanitari ed il miglior utilizzo delle risorse a disposizione, dall'altro i Servizi dell'Assistenza Infermieristica aziendali, che consapevoli delle potenzialità del proprio ruolo all'interno delle organizzazioni, indagano le modalità migliori per assicurare livelli elevati di professionalità e soluzioni organizzative ad essi sinergiche. Dall'incontro delle esigenze di tali attori si è concretizzato il presente progetto che ha per scopo l'individuazione di un panel di criteri di buon funzionamento dei Servizi dell'Assistenza per la regione Veneto.

In particolare, le fasi della ricerca sono così articolate:

- indagine sui modelli organizzativi dei SI;
- rilevazione di criteri di buon funzionamento rispetto ai modelli attuali;
- ipotesi di evoluzione del modello organizzativo (scenari);
- identificazione del percorso per modificare la situazione organizzativa attuale verso l'ipotesi di modello;
- individuazione dei criteri di buon funzionamento rispetto al modello obiettivo.

Coerentemente con le motivazioni che hanno spinto alla realizzazione della ricerca e coerentemente con gli attori nella stessa coinvolti, è stato costituito un gruppo di lavoro composto da Infermieri Dirigenti provenienti dai SI delle ULSS 8, 9, 10, 20 e 22 (gruppo regionale) considerate quali campione rappresentativo delle Aziende della realtà veneta, e da ricercatori SDA Bocconi (gruppo Bocconi). Il progetto ha, quindi, visto l'alternarsi di attività svolte in modo autonomo dal gruppo regionale e dal gruppo Bocconi, e di attività svolte congiuntamente tramite un unico gruppo di lavoro.

La fase iniziale della ricerca ha comportato l'analisi dello stato di fatto, ovvero dei modelli organizzativi esistenti in ambito regionale. Si è quindi provveduto a:

1. effettuare una ricognizione relativa alle delibere aziendali di istituzione dei Servizi Infermieristici (vedi Allegato 1: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale);
2. somministrare un questionario per raccogliere le informazioni più significative in ordine alla struttura, dimensioni e dotazioni dei SI (vedi Allegato 2: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale);
3. analizzare le principali funzioni/attività svolte all'interno dei SI (vedi Allegato 3: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale);
4. indagare attraverso un questionario (distinto per infermieri coordinatori ed altre figure) il "clima organizzativo" ovvero la percezione e le aspettative manifestate dagli operatori che afferiscono ai Servizi nei confronti dei medesimi (vedi Allegato 4: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Successivamente è stato possibile delineare lo scenario di sviluppo per i Servizi Infermieristici, e specificamente indicatori di buon funzionamento riferiti alla struttura, ai processi ed ai risultati.

Conclusioni

La ricerca condotta ha permesso di evidenziare secondo diversi punti di vista, diversi elementi che assumono un ruolo determinante per l'organizzazione del sistema infermieristico e del complessivo sistema aziendale e per l'esercizio delle funzioni di management da parte delle direzioni aziendali. Emergono infatti almeno due importanti considerazioni rispetto ai Servizi Infermieristici: la prima attiene al modello organizzativo del Servizio quale *sistema di governo* della professione infermieristica, la seconda riguarda il valore che possono assumere gli indicatori descritti nella ricerca (di cui la relazione completa è agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) in una prospettiva di miglioramento continuo sia dei Servizi Infermieristici che dell'organizzazione aziendale complessiva.

Per quanto riguarda il modello organizzativo, i dati raccolti sia nelle cinque aziende coinvolte nella ricerca, che quelli acquisiti attraverso la revisione dei documenti forniti dalle altre aziende della regione e da esperienze significative maturate in ambito nazionale ed internazionale, sono una chiara conferma della necessità di presidiare determinate aree di responsabilità ed i relativi processi ed attività riconducibili alla professione infermieristica. Ciò è reso possibile solo in presenza di Servizi chiaramente strutturati e realizzando quelle condizioni ritenute essenziali per poter garantire la gestione e la programmazione delle risorse, per assicurare la qualità e lo sviluppo professionale, per presidiare lo stato di fatto e governare il cambiamento, laddove necessario, dei modelli organizzativi ed assistenziali. In tal senso, risulta ad esempio determinante, la possibilità di assegnare un responsabile a ciascuna area del servizio (ospedaliera, territoriale, formazione, qualità e ricerca), garantendo così al dirigente del servizio la possibilità di occuparsi in via esclusiva della funzione di direzione.

La prima riflessione è strettamente connessa alla seconda, perché proprio gli indicatori descritti rappresentano le condizioni a cui fare riferimento sia per la costituzione dei servizi che per il loro sviluppo. Lo scenario che si

delinea con la descrizione degli indicatori organizzativo/gestionali per il buon funzionamento dei Servizi Infermieristici, evidenzia il ruolo che già gli stessi assumono nelle aziende nel presidiare quei processi organizzativo-gestionali che condizionano poi le strategie aziendali, ma delinea anche prospettive di evoluzione particolarmente significative, ad esempio per quanto riguarda l'accreditamento professionale. Non a caso si è voluto partire proprio dall'analisi dell'esistente, ritenendo indispensabile un'approfondita conoscenza dello stato dell'arte prima di delineare scenari futuri, recuperando l'esperienza finora maturata dai Servizi Infermieristici e gli elementi positivi che l' hanno contraddistinta, introducendo nel contempo quegli elementi in grado di "ancorare" i comportamenti dei professionisti e le scelte aziendali non solo all'esperienza maturata, al know how posseduto, ma anche a elementi che rendano evidente la reale efficacia delle decisioni assunte; ciò permette anche di valutare i risultati ottenuti rispetto alle attività poste in essere, di esprimere giudizi pertinenti in termini di efficacia ed efficienza, di confrontare situazioni organizzative concrete con altre esperienze o con la letteratura esistente, di impegnare infine i professionisti nella ricerca delle soluzioni organizzative migliori. La descrizione delle aree di responsabilità e dei relativi indicatori e criteri di riferimento, dei requisiti che devono caratterizzare la struttura organizzativa dei Servizi Infermieristici, le risorse minime di cui devono disporre, del sistema informativo che regola lo scambio di informazioni e le comunicazioni all'interno dei medesimi e verso l'esterno, la definizione dei processi formativi e delle attività di ricerca avviate, hanno permesso di definire un modello di riferimento per lo sviluppo organizzativo e professionale dei Servizi Infermieristici della regione, sviluppo che risulta essere coerente con le logiche dell'accreditamento professionale che la Regione Veneto sta delineando per le aziende sanitarie ed ospedaliere e che è teso al superamento dell'accreditamento istituzionale visto esclusivamente come possesso di requisiti minimi, indispensabili per poter erogare servizi alla collettività. Il modello descritto nella ricerca è infatti un modello che enfatizza le componenti professionali ed è orientato all'efficacia organizzativa, facendo propri i seguenti elementi:

- Riferimento ai criteri descritti come elementi di valutazione per il raggiungimento degli obiettivi (formulati come indicatori) per le diverse funzioni individuate;
- coerenza con gli obiettivi aziendali e con le logiche di sviluppo professionale nella descrizione degli indicatori dei Servizi;
- tensione al miglioramento continuo;
- gestione per processi;
- coinvolgimento dei professionisti intesi come clienti (interni), destinati degli elementi in uscita dei diversi processi attivati.

La ricerca in sintesi ha permesso di definire da un lato un modello di riferimento per la costituzione/sviluppo organizzativo dei Servizi Infermieristici, dall'altro le condizioni a cui far riferimento per il loro accreditamento, consapevoli delle importanti ricadute che in termini di salute del singolo e della collettività, assume il sistema di governo della professione infermieristica.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 916/04/99

Responsabile Scientifico Folin Marcella - Ente Proponente Università di Padova

“Costruzione in vitro di una bioprotesi ossea omologa”.

La ricerca si proponeva la costruzione *in vitro* di un sostituto osseo ottenuto da una matrice acellulare ossea e osteoblasti omologhi.

Alcuni fra i vantaggi applicativi di tale approccio possono essere:

- disponibilità di quantità di osso non altrimenti ottenibili, in particolare in giovani pazienti;
- possibilità di reintervento a breve termine, in seguito ad eventuale perdita dell'innesto.

Nel modello sperimentale sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley.

Sono stati raggiunti con esito positivo i seguenti obiettivi:

- Ottenimento della matrice ossea acellulare omologa;
- Estrazione di osteoblasti da teche craniche e di cellule stromali da midollo osseo di ratto, coltivazione *in vitro* e loro differenziazione in osteoblasti con l'utilizzo di vari fattori di crescita;
- Sintesi di peptidi segnale e valutazione *in vitro* della loro attività come fattori di adesione per gli osteoblasti;
- Monitoraggio delle modifiche a carico della componente proteica della matrice acellulare;
- Ripopolamento *in vitro* della matrice acellulare omologa con osteoblasti omologhi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 918/06/99

Responsabile Scientifico Galan Alessandro - Ente Proponente ULSS 16 di Padova

“Riutilizzo di taglienti disposable nella chirurgia della cataratta”.

Apprezzamento della capacità di taglio

Nelle TABELLE 1-6 (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) sono riportati i punteggi assegnati a ciascuna lama dopo le sessioni di sterilizzazione. La qualità delle lame dei bisturi e dei taglienti si è dimostrata molto soddisfacente e, a meno di difetti iniziali, tutte le lame hanno mantenuto l'efficienza di taglio non risentendo del processo di sterilizzazione e/o delle manovre di utilizzo (condotte sempre con la massima attenzione).

Sebbene i punteggi non si discostino sostanzialmente dal massimo (5 o 4/5) è risultata apprezzabile da parte dell'operatore una certa *sensazione* sulla differente capacità/efficienza di taglio ed è quindi possibile ordinare gli strumenti secondo la seguente graduatoria per marchio: KAI > GRIESHABER > ALCON.

Tuttavia, la '*resistenza meccanica*' delle lame appare differente:

- ALCON: capacità di taglio buona/ottima; 1 lama (5%) appare spuntata dopo la quinta sterilizzazione (Kit F);
- GRIESHABER: capacità di taglio buona/ottima e stabile; 1 lama (5%) appare spuntata sin dall'inizio (Kit F);
- KAI: capacità di taglio eccellente; 1 lama (5%) appare spuntata sin dall'inizio (Kit D); una lama è spuntata dopo la seconda sterilizzazione (Kit C); 1 lama è spuntata dopo la quarta sterilizzazione (Kit F); 1 lama è spuntata dopo la quinta sterilizzazione (Kit E).

Stabilità delle lame alla sterilizzazione

In generale, si può dire che le lame non subiscono macroscopiche alterazioni a seguito della sterilizzazione: la valutazione alla lampada a fessura non evidenzia infatti modificazioni dell'affilatura o delle caratteristiche delle lame (tutte le foto delle lame alla lampada a fessura, 430 in totale, sono raccolte nel cd-rom allegato al presente report: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) sebbene i dati riportati al punto 4.1 sembrano indicare una minore resistenza dei bisturi KAI rispetto agli altri due marchi (tutti i bisturi sono stati trattati con la massima attenzione da parte dell'operatore sia durante l'utilizzo che durante le manovre di pulizia/sterilizzazione). La sequenza di esperimenti ha invece fatto emergere che i differenti marchi di bisturi manifestano sostanziali differenze relativamente alla resistenza alla sterilizzazione a livello dell'inserzione lama-manico.

In particolare, si segnala quanto segue:

- ALCON: nessun danno apparente dopo la sesta sterilizzazione;
- GRIESHABER: nessun danno apparente dopo la sesta sterilizzazione ad esclusione di due lame (11%) che si staccano/muovono dal supporto dopo la quinta sterilizzazione (Kit C e Kit F);
- KAI: dopo la terza sterilizzazione 8 lame (44%) si presentano con il colletto staccato con perdita di residui collosi che sporcano le lame contenute nello stessa scatola di sterilizzazione; dopo la quarta sterilizzazione tutti i bisturi hanno il colletto staccato con residui di colla (100%).

In sintesi, si potrebbe graduare la '*resistenza dei bisturi alla sterilizzazione*' come segue:

ALCON > GRIESHABER > KAI, un trend esattamente opposto a quello evidenziato per la capacità di taglio.

COMMENTI

Dalle prove da noi condotte emerge che la ripetuta sterilizzazione determina effetti differenti a seconda del tipo (marchio) di strumento considerato.

Gli effetti della sterilizzazioni si manifestano su un preciso elemento strutturale del bisturi, l'attaccatura lama-supporto senza influenzare minimamente la qualità/efficienza di taglio delle lame: i tre marchi di bisturi considerati nella presente ricerca resistono bene a due cicli di sonicazione con enzozyme, successiva pulizia e sterilizzazione in ambiente umido a 121° per 20 minuti; un terzo ciclo di sonicazione/sterilizzazione è superato con successo soltanto dai bisturi ALCON e GRIESHABER mentre il 38% dei bisturi KAI risulta danneggiato e non più utilizzabile; dopo la quarta sterilizzazione il 100% dei bisturi KAI risulta inutilizzabile mentre il 100% dei bisturi ALCON e il 91% dei GRIESHABER risulta ancora utilizzabile (stabilità ed affilatura delle lame) dopo sei cicli.

Da notare che la perdita di residui collosi dei bisturi KAI o GRIESHABER durante la sterilizzazione può sporcare i bisturi presenti nella stessa scatola.

Il fatto che quattro strumenti - tutti taglienti 3.0 - risultino spuntati nel corso dello studio è probabilmente *inevitabile* conseguenza delle manovre di pulizia dell'operatore che, pur agendo con la massima attenzione, non è riuscito a preservarne l'integrità (tali strumenti sono stati comunque utilizzati con efficacia nella successione di operazioni previste dal protocollo): è comunque da notare la tendenza dei taglienti KAI (3 su 4) ad una minore resistenza. In relazione alla capacità di taglio nessuna lama sembra subire alterazioni relative al ciclo di

sterilizzazione ed è quindi ipotizzabile l'utilizzo delle sole lame disposable con apposito porta lame metallico risterilizzabile.

In conclusione, danni evidenti, che potrebbero sconsigliare l'ulteriore utilizzo dello strumento, si manifestano nei bisturi KAI a livello dell'inserzione lama-manico a partire dalla terza sterilizzazione (38% dei bisturi) e riguarda il 100% dei bisturi dopo la quarta sterilizzazione. Danni importanti (tali da non consentire l'ulteriore utilizzo dello strumento) sono evidenziabili nell'11% dei bisturi GRIESHABER dopo la sesta sterilizzazione. Nessun danno è evidente nei bisturi ALCON che manifestano quindi una migliore resistenza.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 920/05/99

Responsabile Scientifico Giacomazzi Giorgio - Ente Proponente ULSS 12 Veneziana

“Progetto parbeve migranti 2000. Studio di modelli di rete di rilevazione intervento per l'approccio multidimensionale ai bisogni di salute delle famiglie straniere immigrate/rifugiate: sperimentazione di moduli flessibili di azione nelle Aziende Ovest Vicentino, Belluno, Veneziana e Ospedaliera di Padova”.

La ricerca condotta si è articolata come studio policentrico, che costituisce la parte iniziale di un progetto più ampio supportato dalla Regione Veneto, interessante tre differenti aree territoriali della Regione, che presentano tipologie di immigrazioni diverse: la Pedemontana Vicentina (Arzignano), l'area di Mestre-Venezia e Belluno. Le tre aree sono caratterizzate anche da organizzazioni dei servizi e da rapporti tra istituzioni già formalmente o informalmente attivate assai differenti. Le aree oggetto di studio rappresentano in questo modo la variegata delle tipologie di immigrazione e di risposte ad essa fornite che caratterizza l'intera Regione Veneto.

Si è creata preliminarmente una rete di referenti locali, di cui facevano parte un coordinatore per ognuna delle ASL coinvolte e dei referenti per ciascuna istituzione interessata (comune, ULSS, scuola). A ciascuna istituzione si è chiesto di segnalare gli elenchi dei minori immigrati presenti nel territorio di loro conoscenza. Si è concentrata l'attenzione in particolare maniera nelle anagrafi dei Comuni, delle Aziende Sanitarie e delle Scuole. Per riutilizzare l'informazione originale di tali anagrafi è stato formulato come strumento di rilevazione un database sintetico dove tutte le informazioni identificative del soggetto ricavate sono ricondotte allo stesso individuo ed in seguito allo stesso nucleo familiare. Si è quindi provveduto a predisporre un elenco nominativo per ogni area monitorata e a valutare le copresenze dello stesso bambino in tutte e tre le anagrafi o viceversa in solo alcune di esse. Si è provveduto quindi alla descrizione della frequenza grezza e specifica di tali minori, delle loro distribuzioni per età e per tipologia di territorio e i cluster d'aggregazione spaziale e d'aggregazione delle carenze di offerta di servizio più vistosa. Un'ultima parte del lavoro condotto per il progetto ha riguardato la restituzione dell'informazione così elaborata come relazione specifica ai referenti locali. In particolare, si sono allertati i sindaci per quanto atteneva le carenze presenti nella loro anagrafe comunale e i responsabili delle ASL per le anagrafi sanitarie.

In sintesi i principali risultati ottenuti sono stati i seguenti:

1. Predisposizione di un archivio unico e uniforme

I dati provenienti dalle varie anagrafi presentavano una notevole disomogeneità delle informazioni raccolte. La prima fase del lavoro è consistita nel rendere uniformi i dati. Il centro di Padova ha proceduto all'inserimento dei dati cartacei, al controllo dei dati elettronici quando supportati dai cartacei, alla conversione dei dati elettronici in un unico formato elaborabile e alla loro pulizia. Gli archivi sono raramente in formato elettronico e, se lo sono, sono in un formato poco adatto alla elaborazione. Inoltre, le informazioni raccolte risultano qualitativamente varie. Le anagrafi considerano variabili diverse come campi di informazioni sul soggetto e non considerano variabili di indiscusso interesse, come ad esempio le informazioni sul nucleo familiare, la nazionalità, la provenienza, la residenza, la data di iscrizione.

La fase successiva del lavoro del centro di Padova è consistita nella produzione di un database informatico composto di tutte le variabili fornite dagli enti dove ad ogni record corrisponde un minore. Il database prodotto permette sia l'inserimento di nuovi nominativi, che la ricerca di quelli già presenti attraverso la digitazione del cognome del minore. Alle 3 ASL sono stati forniti come prodotto i singoli archivi specifici, mantenendo la stessa struttura di archivio, di ricerca e di analisi.

2. Elaborazione delle informazioni ottenute dal database.

(A cura del centro di Padova) Le fonti più rilevanti sono costituite dalle anagrafi comunali e di ASL, seguite dagli elenchi delle scuole e dalla lista degli utenti dei Pronto Soccorso ospedalieri. Le altre fonti di rilevazione, pur indagate, forniscono un numero estremamente ristretto di casi segnalati rispetto alle precedenti. L'intensità del fenomeno è complessivamente assai differente nelle tre ASL: degli oltre 9.500 casi complessivamente segnalati,

oltre 6.500 riguardano l'ASL di Arzignano, 2.200 quella veneziana e poco più di 770 quella di Belluno. La somma, quindi, delle segnalazioni delle fonti interessate comporta la definizione di un fenomeno che impatta in maniera del tutto differente nelle istituzioni delle tre ASL. Andando poi a valutare il dettaglio del ruolo di ciascuna fonte di segnalazione nell'ambito di ciascuna ASL emerge chiaramente come le anagrafi comunali e di ASL risultino particolarmente carenti e parziali nell'ASL di Venezia. Nella stessa ASL gli iscritti alle scuole sommano circa il 17% dei soggetti comunque rilevati contro il 20% di Arzignano e il 25% di Belluno. Ciò induce a ritenere che il peso relativo delle singole istituzioni considerate come fonte di rilevazione è estremamente variabile secondo l'area geografica considerata e il tipo di immigrazione che essa sottende. L'anagrafe dell'ASL segnala più casi di quella comunale per le primissime età della vita, mentre per l'età superiore ai 14 anni, gli iscritti all'anagrafe comunale prevalgono rispetto a quelli iscritti all'anagrafe sanitaria. Le differenze anche rilevanti delle distribuzioni percentuali indicano differenti modalità di accedere alle istituzioni dei soggetti migranti e quindi bisogni di salute inevasi in maniera diversa per le diverse classi di età. La frequenza relativa dei non iscritti all'anagrafe sanitaria rimane sostanzialmente costante intorno al 5% dei casi per classe d'età, tranne che per i soggetti di età superiore ai 14 anni per i quali la non iscrizione all'anagrafe sanitaria costituisce un fenomeno di gran lunga più rilevante. L'utilizzo del Pronto Soccorso invece è massimo nelle prime fasce d'età, e decade successivamente per tutta l'età scolare, ma cresce sensibilmente dai 14 ai 18 anni, età che, come abbiamo già detto, corrisponde alla minor iscrizione alle anagrafi sanitarie. Soggetti non iscritti all'anagrafe non possono accedere ad alcuna offerta sanitaria se non quella legata all'emergenza. È evidente come il permanere di una simile situazione non soltanto comporti una minor offerta di attività riguardanti la salute di questi soggetti, ma anche un aumento dell'uso improprio degli unici servizi che rimangono loro disponibili. In altre parole, per l'amministrazione pubblica il permanere di una tale condizione non comporta una riduzione dell'impegno di risorse, ma un loro utilizzo inadeguato. Il controllo della copertura relativa delle fonti ha messo in evidenza che molto frequentemente un soggetto noto ad una fonte istituzionale non è noto ad altre. Ciò ci permette di mettere in evidenza un fenomeno generalmente non considerato: quello, appunto, dei casi noti soltanto ad un'istituzione per la quale non è previsto l'accesso, quindi, agli interventi forniti da tutte le altre.

3. Relazione specifica ASL n° 12 Veneziana

Il numero totale di record processati ammonta a 2.207 ripartiti tra le seguenti fonti:

- Anagrafe Comunale	851
- ASL	353
- Scuole	372
- Pronto Soccorso	486
- Campo profughi	145

Il totale dei minori immigrati risultante dall'incrocio delle fonti è pari a 1.391; di questi il 38,8% non risulta iscritto all'anagrafe comunale, il 25,4% è segnalato nell'anagrafe dell'ASL e il 17,2% risulta in entrambe le anagrafi.

Degli immigrati presenti nei campi profughi di San Giuliano e Zelarino il 57,9% risulta registrato in anagrafe, il 13,1% è registrato dall'ASL (di cui l'8,3% non risulta nel comune), il 15,2% non è segnalato né dal comune né da nessun'altra fonte.

I minori immigrati, di cui il 46,6% è di sesso femminile, rappresentano il 3,6% dei minori residenti nell'ASL e il 3,3% dei minori con età inferiore ad un anno.

Un minore su sei è nato sul territorio appartenente all'ASL 12.

Analizzando il livello di scolarizzazione emerge che il 16,3% dei minori con età inferiore ai 5 anni frequenta la scuola materna, 2 su cinque si reca alla scuola dell'obbligo e il 12% è iscritto in una scuola superiore.

Solo l'anagrafe sanitaria e i campi profughi hanno fornito informazioni relative ai nuclei familiari che risultano pari a 214 per la fonte ASL e 45 per la fonte campo profughi. Dall'anagrafe sanitaria emerge che il 78% dei nuclei comprende un solo minore, al contrario i nuclei familiari segnalati dai campi profughi risultano composti da un numero maggiore di minori: l'87% delle famiglie presenta più di un minore.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Il lavoro da noi prodotto ha fornito immediatamente dei risultati estremamente utili per predisporre subito azioni concrete a favore dei minori migranti. Il fatto stesso di aver evidenziato come nello stesso territorio le istituzioni che dovrebbero prendersi cura di questi soggetti da punti di vista diversi non trasmettano le informazioni essenziali per effettuare realmente le azioni che sono loro proprie, ha aperto le possibilità che tale passaggio di informazione sia attuato concretamente. In altre parole, un minore presente in un territorio e noto ad un servizio sociale perché seguito in quanto abitante in un campo profughi, dovrebbe e potrebbe già ora senza nessun'altra risorsa aggiuntiva essere segnalato e/o iscritto all'anagrafe dell'ASL, a quella del Comune e a quella delle scuole. Ciò permetterebbe al bambino di accedere all'istruzione, all'assistenza sanitaria completa e a quella sociale,

interventi tutti questi che attualmente gli vengono di fatto negati. È interessante sottolineare ancora come la fase di restituzione dell'informazione che ha costituito una parte integrante del progetto, abbia prodotto delle ricadute soprattutto a livello di alcuni Comuni, che si sono attivati per correggere le lacune delle proprie anagrafi e per collegarle più compiutamente con quelle della ASL.

Lo strumento che abbiamo creato e messo a disposizione per le ASL che hanno partecipato al progetto, e che potrà ora essere usato da tutta la Regione, è il prodotto principale del progetto che intende dare una risposta ai suddetti quesiti. È uno strumento utile, poiché permette di costruire un'anagrafe comune e mutuamente aggiornabile da parte dei vari servizi; e consente di mettere in comunicazione i servizi socio-sanitari già esistenti, evitando di doverne creare di nuovi, al fine di monitorare la popolazione immigrata, i suoi bisogni, l'uso dei servizi e di mettere infine in atto delle azioni specifiche. L'uso di uno strumento unico e condiviso facilita l'integrazione dei servizi, permettendo la creazione di un "linguaggio" comune che tende a ridurre le barriere culturali e professionali.

Frequentemente in regione, la logica usata nell'indagine dei bisogni specifici della popolazione degli immigrati da parte dei servizi locali porta alla programmazione di risposte specifiche per il problema, con la creazione di servizi ad hoc, che purtroppo non sempre sono efficaci. In questo modo, si creano di fatto dei duplicati di servizi già esistenti, con un notevole impegno di risorse, che potrebbe essere evitato promuovendo il riorientamento e l'integrazione dei servizi, la formazione specifica degli operatori. Il nostro lavoro propone come strumento la realizzazione di un'anagrafe integrata dei casi, comune a tutti i servizi, per la quale abbiamo fornito un prodotto fruibile anche da subito e che può essere messo in rete tra le istituzioni coinvolte nella gestione e nell'assistenza delle famiglie.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 922/04/99

Responsabile Scientifico Grandi Claudio - Ente Proponente Università di Padova

“Studio di fattori che favoriscono l'angiogenesi nell'impianto in vivo di matrici acellulari biologiche”.

L'angiogenesi è un importante processo biologico multistadico mediante il quale le cellule endoteliali si dividono e migrano per formare nuovi vasi sanguigni. Inizialmente le cellule endoteliali vengono attivate da uno stimolo angiogenico, secernono proteasi per degradare la membrana basale e la matrice extracellulare, e migrano per formare un abbozzo di capillare. Quest'ultimo ingrandisce, formando un lume e una nuova membrana basale. Successivamente due abbozzi si uniscono e, da tale struttura, si genera una seconda generazione di capillari. Negli individui normali, in uno stato non patologico, le cellule endoteliali sono in una fase quiescente di crescita e il loro turnover nei vasi sanguigni è di alcuni anni.

L'angiogenesi è indispensabile in numerosi processi, come l'embriogenesi e la crescita nonché in condizioni fisiologiche, quali il rimodellamento vascolare durante il ciclo mestruale, la gravidanza, la cicatrizzazione o la rigenerazione tissutale che avviene, per esempio, durante la guarigione di lesioni cutanee di varia natura. Infatti durante tale processo la formazione di neovasi promuove la migrazione cellulare e quindi la ricostruzione del tessuto danneggiato. Analogamente, nell'impianto in vivo di matrici biologiche utilizzate come sostituti di tessuto, l'angiogenesi svolge un ruolo importante nel determinare il ripopolamento della matrice stessa da parte delle cellule del ricevente. Recentemente numerosi ricercatori hanno utilizzato con successo matrici acellulari di varia provenienza, con lo scopo di reintegrare tessuti mancanti o difettosi: cute, tratti di uretra, valvole cardiache e tratti di intestino. In tutti questi lavori è emerso come la struttura tridimensionale della matrice acellulare omologa funzioni da guida alla migrazione delle cellule, trasformandosi gradualmente da innesto passivo a tessuto in grado di rigenerarsi. L'analisi istologica degli esiti degli impianti ad alcuni giorni dall'innesto ha evidenziato come la comparsa di neovasi sia il primo stadio che precede la ricolonizzazione della matrice da parte delle cellule del ricevente e il suo successivo rimodellamento. Stimolando l'angiogenesi, si potrebbero diminuire i tempi necessari per la completa integrazione della matrice nei tessuti dell'ospite e, in definitiva, migliorare il risultato dell'impianto. Oltre ad essere richiesta in condizioni fisiologiche l'angiogenesi, può anche contribuire alla patogenesi di varie malattie. Infatti, l'angiogenesi è regolata da un delicato equilibrio tra fattori pro- e anti-angiogenici e una non controllata formazione di vasi avviene in molte condizioni patologiche in cui la presenza di fattori angiogenici sovrasta quella degli inibitori. Alcune condizioni caratterizzate da un'eccessiva angiogenesi comprendono la genesi tumorale, le retinopatie diabetiche, l'artrite reumatoide e la psoriasi.

Numerosi sono i mediatori angiogenetici, la maggior parte dei quali sono fattori di crescita di natura peptidica. Anche i componenti della matrice extracellulare e vari prodotti di degradazione della fibrina e dei collagene possono stimolare (vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factors) o inibire (chemochine C-x-C, trombospodina, SPARC, angiostatina) l'angiogenesi. Tra i mediatori di natura peptidica l'angiogenina, una proteina di 14kD, appartenente alla superfamiglia delle ribonucleasi, svolge un ruolo particolarmente efficace e

significativo, anche se ancora oggi il suo meccanismo d'azione non è ancora completamente chiarito. Ciò può essere attribuito sia al complesso meccanismo biochimico dell'angiogenesi, sia alla comprensione delle relazioni struttura-attività dell'angiogenina e più in generale alle relazioni tra questa proteina e i membri dell'ampia famiglia delle ribonucleasi.

Numerosi studi hanno messo in evidenza il contributo fornito dall'angiogenina nel processo dell'angiogenesi. L'ipotesi maggiormente accreditata sull'azione angiogenica dell'angiogenina può essere così riassunta: il ruolo dell'angiogenina è svolto in diversi stadi del processo di angiogenesi; l'angiogenina si lega all'actina presente sulla superficie delle cellule endoteliali confluenti; si dissocia con l'actina ed attiva il sistema delle proteasi cellulari con la conseguente invasione cellulare; appena le cellule migrano verso la membrana basale si determina una diminuzione nella densità con l'attivazione dell'espressione del recettore di 170kD per l'angiogenina; ciò determina il legame di ulteriore angiogenina che subisce un processo di endocitosi e di traslocazione nel nucleo; in questo processo le cellule sono stimolate alla mitosi ed alla proliferazione, riempiendo così gli spazi aperti dalle cellule che sono migrate; non appena le cellule divengono confluenti, viene disattivata l'espressione del recettore, processo che regola il nuovo network dei vasi sanguigni.

Gli studi sperimentali oggetto del presente programma di ricerca condotti nel primo anno di ricerca hanno avuto come scopo la comprensione del ruolo dell'angiogenina e di alcuni suoi frammenti peptidici, ottenuti sulla base di studi di bioinformatica, con lo scopo di individuare regioni strutturali della molecola in grado di stimolare il processo di angiogenesi in vitro in impianti cellulari volti a ricolonizzare la matrice extracellulare da parte delle cellule del ricevente e il suo successivo rimodellamento. Gli studi di bioinformatica sono stati condotti sull'angiogenina bovina, una proteina molto simile a quella umana, ottenibile, più facilmente ed in buona quantità (per permettere la preparazione dei peptidi), per isolamento dal latte fresco. L'angiogenina bovina, isolata dal latte, rappresentava quindi un ottimo modello da utilizzare per studi di purificazione-caratterizzazione strutturale della proteina stessa e per studi in vitro di attività biologica.

Tra gli obiettivi del primo anno di lavoro previsto dal progetto di ricerca c'era anche lo studio in vitro, usando cellule endoteliali bovine, dell'azione angiogenica sia dell'angiogenina intera purificata dal latte che dei frammenti peptidici da essa derivati per frammentazione chimico-enzimatica. Tuttavia a causa dei recenti controlli sulla carne bovina, allo scopo di individuare animali portatori del prione responsabile dell'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) gli studi hanno avuto un certo rallentamento. Infatti non era possibile il prelievo da bovino di cellule endoteliali in quanto gli animali dopo la macellazione dovevano restare alcuni giorni in attesa del test sul prione e durante questo periodo le cellule endoteliali muoiono. Dunque, la recente problematica della BSE fa sì che non si possano prelevare da bovino cellule endoteliali ancora viventi per studi in vitro di angiogenesi. Per tale motivo, non essendoci vincoli sui suini, si è anche pensato di usare cellule endoteliali di maiale per studi sull'attività angiogenica dell'angiogenina. L'analogia strutturale tra l'angiogenina delle due specie animali sia per quanto riguarda la struttura primaria che terziaria è notevole (69%), tuttavia, per maggiore efficienza, sarebbe preferibile usare angiogenina porcina per stimolare le rispettive cellule endoteliali nel test angiogenico.

A causa di tale rallentamento, nel secondo anno di ricerca si è dunque proceduto alla purificazione-caratterizzazione dell'angiogenina da latte suino per condurre saggi di attività angiogenica sulle rispettive cellule endoteliali porcine, mentre i saggi di attività angiogenica dell'angiogenina bovina sono stati condotti non su cellule endoteliali bovine, ma su colture di cellule endoteliali estratte da microcircolo cerebrale di ratti Sprague-Dowley.

CONCLUSIONI

L'angiogenina bovina è stata purificata con buona resa nel primo anno di attività ed è stata utilizzata per condurre studi di angiogenesi e di proliferazione cellulare in vitro nel secondo anno di attività di ricerca. Gli esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'angiogenina risulta essere uno dei fattori salienti del processo di angiogenesi ed ora la stessa è disponibile per effettuare altri studi in vitro, con numerose linee cellulari endoteliali isolate da diversi distretti corporei di diversi animali e (ove possibile) umani ed in vivo per valutare la capacità dell'angiogenina di stimolare la vascolarizzazione di matrici biologiche impiantate. Gli studi condotti nel primo anno di attività sulle sequenze amminoacidiche dell'angiogenina umana, bovina e sulla ribonucleasi bovina hanno permesso di individuare le regioni sequenziali potenzialmente responsabili di una funzione biologica quali riconoscimento proteina-proteina; interazione col recettore, siti antigenici, sequenze conservate e ripetute all'interno di una famiglia di fattori, potenziali sequenze immunogeniche. Alcuni dei peptidi così individuati sono stati preparati a partire dalla proteina intera per proteolisi limitata e sono stati purificati, mediante tecniche analitiche HPLC, e caratterizzati. Sono invece in corso gli studi dal punto di vista della loro attività biologica angiogenica in vitro e per valutare la loro eventuale immunogenicità.

Purtroppo gli intoppi burocratici incontrati a causa della BSE che colpisce i bovini da cui dovevamo ricavare cellule endoteliali per saggi in vitro hanno rallentato il lavoro di ricerca e pertanto non siamo stati in grado di concentrare il lavoro in uno degli obiettivi di questo progetto e cioè nel valutare l'immunogenicità della

angiogenina e dei frammenti da essa derivati e nel produrre gli eventuali anticorpi anti-peptide da utilizzare per mappatura immunoistochimica degli impianti di matrice biologica e di incorporazione nel tessuto normale. Per ovviare tale problema, nel secondo anno di ricerca si è anche proceduto alla purificazione-caratterizzazione dell'angiogenina da latte suino per condurre saggi di attività angiogenica sulle rispettive cellule endoteliali porcine. L'isolamento della angiogenina da latte di scrofa, dove, in analogia a quanto accade per il latte vaccino, tale proteina potrebbe essere contenuta ha presentato alcune difficoltà legate soprattutto alla piccola quantità di latte disponibile ed alla maggiore concentrazione in lipidi e proteine del latte di scrofa che determina soluzioni dense e di difficile centrifugazione. La modesta quantità di latte a disposizione ci ha permesso di avanzare qualche ipotesi di presenza della proteina sulla base della tecnica SDS-PAGE, ma non è stato possibile ottenere la verifica del peso molecolare con lo spettrometro di massa.

E' in corso l'isolamento di numerose linee cellulari endoteliali da diversi distretti corporei di diversi animali e (ove possibile) umani, come sopra descritto, ma date le difficoltà che spesso si incontrano per l'isolamento ed il mantenimento in coltura delle linee cellulari ci si è proposti di utilizzare cellule staminali da cordone ombelicale umano per ottenere cellule endoteliali. Infatti è possibile indurre la differenziazione di cellule progenitrici staminali cordonali umane in cellule endoteliali mediante interazione con cellule mononucleate cordonali attivate con fitoemagglutinina (PHA). E' anche possibile isolare da sangue cordonale una popolazione, ben distinta fenotipicamente e funzionalmente, di precursori endoteliali circolanti che esprimono il recettore vascolare endoteliale 2 (VEGFR-2), proprio delle cellule endoteliali e il marker AGI33, proprio delle cellule staminali ematopoietiche. Le linee cellulari endoteliali ottenute da sangue di cordone ombelicale non solo permetteranno la messa a punto di saggi *in vitro* di angiogenesi per studiare l'attività biologica dell'angiogenina da noi purificata e dei fattori da essa derivati, ma potranno essere direttamente implicate nell'angiogenesi *in vivo*.

In prospettiva si prevede di continuare la sperimentazione esaminando la capacità angiogenica dell'angiogenina *in vivo*.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 923/04/99

Responsabile Scientifico Ius Paolo - Ente Proponente ULSS 9 di Treviso

“Studio di una bioprotesi colonizzata con endotelio dell'ospite”.

La ricerca ha interessato la progettazione, la realizzazione e la messa a punto dei materiali e delle condizioni operative di un bioreattore, progettato dall'Ing. Mauro Grigioni dell'ISS, con lo scopo di ottenere la ri-endotelizzazione *in vitro* di condotti valvolati e vasi preventivamente decellularizzati, attraverso la simulazione delle condizioni di flusso esistenti nell'apparato circolatorio

Sono iniziate le prime prove di riendotelizzazione che pur non essendo soddisfacenti gettano promettenti premesse per l'approfondimento della ricerca nell'ambito del finanziamento M.I.U.R. (F.I.R.B.) ottenuto dall'Ing. Mauro Grigioni dell'ISS che prevede la differenziazione delle cellule staminali in cellule endoteliali tramite un dispositivo che simuli *in vitro* le condizioni del flusso sanguigno.

FASE IN VITRO

Colture di cellule endoteliali cardiache

a. Estrazione

Le cellule sono state estratte da cuore di ratti Sprague-Dawley adulti tramite digestione enzimatica con collagenasi B (0.25%) e dispase (0.25%) e seminate in piastre Petri precedentemente condizionate con collagene ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e fibronectina umana ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Le cellule sono state coltivate nel terreno di coltura Endothelial Cell Growth Medium MV 2 kit contenente 1% Antibiotico-Antimicotico, 5% Siero Fetale Bovino, Idro-cortisone ($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$), Vascular Endothelial growth Factor ($0,5 \text{ ng}/\text{ml}$), Basic fibroblast factor ($10 \text{ ng}/\text{ml}$), R3 IGF-1 ($20 \text{ ng}/\text{ml}$), Acido ascorbico ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), Epidermal growth factor ($5 \text{ ng}/\text{ml}$).

b. Purificazione

Successivamente sono state ottenute colture contenenti esclusivamente cellule endoteliali grazie ad una separazione immunomagnetica della coltura primaria.

A tal fine sono state utilizzate biglie magnetiche di polistirene, dynabeads M-450 tosylactivated, condizionate con un anticorpo anti-CD31. Le cellule (10^6 cellule/ml) provenienti dalle colture primarie sono state risospese in tampone fosfato contenente lo 0,1% di BSA e 5 biglie/cellula. Dopo un'incubazione a 4°C per 30 minuti e 4 lavaggi con terreno completo per eliminare le cellule negative, le cellule endoteliali attaccate alle biglie sono state seminate e coltivate nelle condizioni precedentemente descritte.

c. Immunocitochimica

Le colture di cellule endoteliali sono state lavate con PBS, permeabilizzate, fissate per 10 minuti con una soluzione di HCl ed etanolo (1 parte di HCl al 1%, 99 parti di etanolo al 70%) e ulteriormente lavate con PBS. Dopo aver inattivato le perossidasi endogene, è stato utilizzato il kit LSAB usando come anticorpo primario l'anticorpo monoclonale anti-fattore di Von Willebrand (1:300 in 0.5% BSA). E' stato sempre condotto, in parallelo, un controllo negativo in cui si è utilizzato lo stesso metodo omettendo l'uso dell'anticorpo primario per valutare eventuali reazioni aspecifiche.

d. Caratteristiche funzionali

Il matrigel è stato scongelato in ghiaccio a 4°C per una notte e posto in uno strato sottile (50µl/pz) in piastre da 24 pozzetti. Le cellule sono state seminate ($2,5 \times 10^4$ cellule/cm²) su Matrigel con terreno base (senza fattori di crescita) supplementato con 10% di siero e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica. Le colture sono state quindi incubate per 18h a 37°C, successivamente fissate in formaldeide 10% (in PBS) e osservate al microscopio ottico a contrasto di fase.

Risultati

Colture di cellule endoteliali

L'identificazione del fenotipo cellulare delle colture dopo immunoseparazione è stato effettuato tramite colorazione immunocitochimica utilizzando un anticorpo diretto contro il fattore di Von Willebrand, glicoproteina che viene esclusivamente prodotta dalle cellule endoteliali e che rappresenta una delle componenti principali dell'aggregazione e dell'adesione piastrinica. Le colture erano fortemente positive per tale fattore fino alla V subcoltura (fig. 1). L'analisi al microscopio ottico ed elettronico a scansione ha evidenziato che le cellule fino alla V subcoltura non subivano variazioni nella morfologia (dati non mostrati).

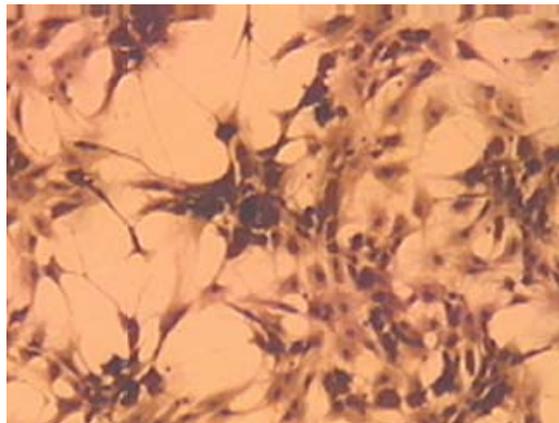


Figura 1. Immunocitochimica di colture di cellule endoteliali (ingrandimento x50)

Inoltre, fino alla IV subcoltura le cellule erano in grado di formare strutture simili ai capillari su matrigel, estratto solubile della membrana basale del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm di topo (fig. 2).



Figura 2. Colture di cellule endoteliali su matrigel (ingrandimento x50)

I dati raccolti hanno evidenziato che le cellule endoteliali non subiscono variazioni di forma e continuano ad esprimere il fattore di Von Willebrand fino alla V subcoltura. Tuttavia, la capacità di formare strutture tubulari in matrigel veniva persa a partire dalla V generazione. Per tale motivo, nella successiva sperimentazione verranno utilizzate cellule endoteliali fino alla IV subcoltura.

FASE PROGETTUALE

La pompa peristaltica e il bioreattore rappresentano gli elementi fondamentali del circuito, grazie al quale le cellule endoteliali in terreno di coltura devono fluire all'interno di un vaso o di un condotto valvolato, precedentemente resi acellulari, per ricostruire un sostituto vasale vitale.

Prima verifica

Dopo una prima verifica dei materiali ed una valutazione degli eventuali problemi tecnico-teorici sulla messa in opera del bioreattore sono stati costruiti alcuni nuovi componenti modificati in materiale autolavabile quali:

- 1) camera centrale esterna di diverse dimensioni per poterla adattare ai condotti valvolati e vasi con diversi lumi, diametri e lunghezze;
- 2) predisposizione per l'inserimento di rubinetti ad una via, nella camera centrale, per consentire il riempimento con soluzione fisiologica o terreno di coltura, esternamente al circuito interessato al flusso con cellule, onde bilanciare le pressioni interne al vaso evitandone dilatazioni e conseguenti deformazioni sotto l'azione della pompa peristaltica;
- 3) progettazione e costruzione di supporti filettati per l'attacco dei rubinetti del circuito "esterno" di riempimento;
- 4) nuovo sistema di bloccaggio per vasi di diverso diametro e spessore di parete creato per limitare al minimo la manipolazione dei preparati durante il bloccaggio;
- 5) anelli di adattamento a tenuta stagna, per il collegamento tra il corpo centrale del bioreattore ed il sistema di bloccaggio del vaso o condotto valvolato;
- 6) rubinetterie in vetro modificate per il collegamento tra soluzione di riempimento del circuito "interno" (percorso: sacca o flacone di terreno di coltura - pompa peristaltica - ingresso bioreattore - vaso da trattare - uscita bioreattore - rubinetti di collegamento - pompa peristaltica) ed il circuito stesso, con possibilità di separazione e chiusura del circuito su se stesso dopo riempimento e contemporanea eliminazione dell'aria in eccesso.

Le connessioni tra i vari componenti sono eseguite con tubo in silicone (Tygon - medical grade) con diametro interno di 10 mm e diametro esterno di 14 mm. Da sottolineare che tutti i collegamenti e connessioni tra i pezzi assicurano che tutte le operazioni siano eseguite in maniera completamente stagna.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 927/05/99

Responsabile Scientifico Marcazzò Luciano - Ente Proponente ULSS 5 di Arzignano

“Progetto Parbeve Migranti 2000. Studio di modelli di rete di rilevazione intervento per l'approccio multidimensionale ai bisogni di salute delle famiglie straniere immigrate rifugiate: sperimentazione di moduli flessibili di azione nelle Aziende Over VI BL PD”.

Il numero totale di "Questionari per la rilevazione dei bisogni delle famiglie immigrate" raccolti e sottoposti ad analisi è pari a 84.

I questionari sono stati somministrati per un periodo di osservazione della durata di 15 giorni per ogni minore al suo accompagnatore adulto, nei seguenti servizi: Reparto di pediatria, Pediatria di Comunità, Dipartimento di Igiene e Medicina Preventiva, Consultorio familiare, Sportello distribuzione tessere sanitarie leggere, Sportello immigrati, Pronto Soccorso, Distretto, Servizio per l'Età Evolutiva, Servizio per la tutela dei minori. Vengono di seguito riportati i dati di frequenza delle interviste effettuate per Servizio di afferenza (Tabella 1):

Tabella 1: N° di interviste per Servizio di afferenza

<i>Servizio di afferenza</i>	<i>Frequenza</i>	<i>N</i>
Reparto di pediatria	30,9%	25
Pediatria di Comunità	27,2%	22
Dipartimento di Igiene e Medicina Preventiva	13,6%	11
Consultorio familiare	8,6%	7
Servizio per distribuzione tessere sanitarie	6,2%	5
Sportello immigrati	6,2%	5
Pronto Soccorso	2,5%	2
Distretto	2,5%	2
Servizio per l'Età Evolutiva	1,2%	1
Servizio per la tutela dei minori	1,2%	1
TOTALE	100%	81
missing		3

I soggetti indagati sono di sesso maschile nel 59,1% dei casi e provengono per lo più dall'Africa(31.3%), dall'est Europa (25%) e dall'India (25%).

Nella maggior parte dei casi il nucleo familiare a cui appartiene il minore risulta composto di 3 (30,56%) o 4 (36,1%) componenti tra i quali sono presenti 1 (41%) o 2 (39,3%) minori .

I soggetti intervistati sono presenti in Italia da più di 3 anni nel 77,1% e da meno di 1 anno nel 3,6%.

Il motivo dell'accesso al servizio è soprattutto d'ordine sanitario (urgenza/emergenza mediche o chirurgiche, visite specialistiche, ricovero, *day hospital*, *day surgery*, vaccinazioni) con una frequenza pari al 73,7% dei casi intervistati, e d'ordine burocratico-amministrativo nel 12, 5% dei casi.

Alla domanda su chi avesse fornito l'informazione riguardo l'esistenza del servizio e le modalità di accesso allo stesso al quale i soggetti indagati si sono rivolti, gli intervistati hanno nel 45,3% di averle avute dalla propria rete informale, ossia da parenti o amici, associazioni di utenza, Caritas, Sindacati, mass-media, dal lavoro, e nel 52% dei casi dagli organi ufficialmente predisposti all'assistenza e al servizio della popolazione, i.e. operatori sanitari, scuola, comune, servizi sociali e servizi territoriali, delle situazioni.

Analizzando la conoscenza dei servizi dal punto di vista quantitativo, si può inferire che i soggetti contattati non conoscono nessun servizio suggeriti nel 17,9% dei casi, conoscono una sola tipologia di servizio nella stessa percentuale (17,9%), il 13,1% ne conosce 3 o 5, un numero maggiore di servizi è noto ad un numero progressivamente minore di persone. Dalle risposte ricevute, si possono individuare 3 gradi di conoscenza dei servizi: nel grado inferiore non è assolutamente noto il servizio; in quello intermedio è nota solo l'esistenza dello stesso, ed, infine, in quello superiore, è nota sia l'esistenza sia la possibilità di accesso allo stesso. Si può così stilare una graduatoria dei servizi, dal più familiare al più ignorato/misconosciuto, in cui al primo posto si trova il medico di medicina generale con la pediatria di libera scelta (conoscenza medio-alta nel 72,6% dei casi), al secondo il distretto socio sanitario e al terzo l'Ufficio anagrafe. Occupano gli ultimi posti il SERT, l'informagiovani e l'ATER.

Dall' analisi bivariata dei dati, risulta che vi è una relazione tra tempo di permanenza in Italia e numero di servizi noti: nel dettaglio, si rileva che chi si trova in Italia da più di 3 anni conosce più di 2 servizi con una frequenza maggiore (57,8%) rispetto a coloro che si trovano in Italia da un periodo di tempo minore ai 3 anni (35%).

Tramite un'analisi bivariata si rappresenta il fatto che i soggetti provenienti dall'Albania risultano coloro che con maggiore frequenza (77,8%) conoscono pochi servizi rispetto ai soggetti provenienti dall'Africa, dall'India e dal restante est Europa.

Risulta che i soggetti che si rivolgono ai servizi sanitari per urgenze o emergenze cliniche sono coloro che in una percentuale maggiore di casi (61,5%) conoscono un numero minore di servizi (meno di 2 servizi) se confrontati a coloro che invece si rivolgono ad una struttura sanitaria per motivi burocratico-amministrativi o informazioni (40%), visite mediche o ricoveri o day hospital-day surgery in elezione(34,78%) o altro (36,3%).

I nuclei familiari composti da un numero maggiore di 5 persone risultano più informate, e quindi forse più integrate, se si considera il numero di servizi a loro noti: queste, infatti, conoscono in percentuale maggiore più di due servizi, rispetto a nuclei familiari composti da meno di 3 persone o da 4 componenti. I nuclei più numerosi sembrano avere più strumenti di conoscenza della rete dei servizi.

Approfondendo l'analisi dei componenti della famiglia si scopre che le famiglie con più di due minori conoscono più servizi con frequenza maggiore rispetto ai nuclei con un solo minore o con tutti figli maggiorenni, quasi a mostrare una maggiore integrazione o tutela da parte della comunità delle famiglie con figli.

La popolazione di immigrati indagata tramite i questionari, nel comune di Arzignano, ha per lo più: carattere stanziale, nel senso che si trova in Italia da un periodo di tempo maggiore di 3 anni (77,1 %), infatti è formata da famiglie immigrate di seconda o terza generazione, con figli a carico, ed è formata per la maggior parte dei casi da soggetti provenienti dall'Est europeo o dall'Africa. Dalla nostra analisi, emergono alcune peculiari informazioni sulle caratteristiche di questa popolazione.

Risulta estremamente carente la conoscenza da parte dei soggetti immigrati dei servizi e delle istituzioni quali, per esempio, il Distretto socio-sanitario (solo il 35,7% lo conosce), il servizio sociale comunale (25%), la Scuola (14,7%) e il Consultorio (7,1%). E' sorprendente che questo accada in una comunità immigrata di tipo stanziale e con nuclei familiari importanti. Sono pertanto da considerare inefficaci le modalità attraverso le quali le istituzioni rende noti, e perciò accessibili, i servizi che sono diritto imprescindibile di ciascun cittadino, autoctono o meno. Il fatto che gli utenti immigrati abbiano poca coscienza dei servizi a loro disponibili e a cui hanno diritto, anche come irregolari, è poco tutelante nei casi a rischio che necessitano di tutela, o comunque può far precipitare condizioni di vulnerabilità. E' necessario che i servizi ripensino alle strategie da mettere in atto per rendersi visibili agli utenti, e per mettersi in rete tra loro, in modo da rendersi attivamente disponibili dell'utente. Sono i servizi che, secondo i bisogni, si attivano e non gli utenti che riconoscono i loro bisogni e cercano risposte.

Nello specifico, abbiamo rilevato come la maggiore conoscenza dei servizi disponibili nel territorio, appannaggio, comunque di una minoranza dei soggetti indagati e da interpretare come una maggiore integrazione nel tessuto sociale, sia propria dei nuclei familiari più numerosi e con figli. Di questo fenomeno si possono ipotizzare due ordini di cause: da un lato il carattere di stabilità della permanenza in una regione rende possibile la formazione di una famiglia o la ricostituzione di essa (ricongiungimenti), e dall'altro la presenza di minori in una famiglia crea, di fatto, occasioni di scambio, incontri, etc. tali da rendere più erudito ciascun soggetto della realtà che lo circonda. Questo porta a sottolineare la necessità di un'attenzione e di una tutela maggiore dei nuclei più ridotti, in particolare gli adulti soli, i bambini non accompagnati, perché più vulnerabili. Inoltre, è rilevante sottolineare come ci sia un rapporto diretto tra l'uso più frequente dei servizi di urgenza/emergenza e una minore conoscenza da parte degli utenti degli altri servizi disponibili. Questo porta alla luce il fenomeno dell'uso improprio dei servizi, che vede tra i fattori determinanti, la mancanza d'informazione sulla possibilità d'accesso ai servizi d'assistenza più specifici e, nell'ambito precipuo della popolazione immigrata, quello degli immigrati irregolari. E' conseguenza diretta di queste considerazioni affermare che i servizi sono globalmente poco noti e scarsamente accessibili ai soggetti immigrati e anche nel caso in cui non lo siano, risultano spesso usati in modo improprio.

Il nostro lavoro evidenzia come sia azione prioritaria nell'ambito delle strategie nei confronti della popolazione immigrata, quella di favorire la messa in rete dei servizi coinvolti, attorno all'utente. La risposta ai bisogni specifici dell'utente, soprattutto per l'immigrato, deve pertanto dipendere da: lavoro integrato dei servizi, e non dall'iniziativa personale degli utenti.

(p.s. presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale sono presenti tabelle che esemplificano i dati della sintesi).

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 929/02/99

Responsabile Scientifico Murer Bruno – Ente Proponente ULSS 12 Veneziana

“Diagnosi precoce cito ed istologica del mesotelioma maligno diffuso della pleura: definizione dei criteri di approccio diagnostico e valutazione dei fattori prognostici”

Introduzione

Il mesotelioma maligno diffuso della pleura è un tumore relativamente raro, la cui incidenza è in continuo aumento soprattutto nelle aree più industrializzate compresa la Regione Veneto. E' una neoplasia altamente aggressiva che si associa ad una sopravvivenza media di 9-12 mesi. Va tuttavia sottolineato che in casi diagnosticati in fase relativamente precoce, che si trovano in uno stadio limitato e che sono sottoposti ad intervento chirurgico di pleuropneumonectomia extrapleurica seguita da chemio e radioterapia, la sopravvivenza migliora sensibilmente con sopravvivenze superiori ai tre anni. La diagnosi precoce di queste neoplasie è pertanto fondamentale per dare speranze di sopravvivenza accettabili. Ciò rende necessario lo sviluppo di procedure diagnostiche riproducibili che consentano di formulare una diagnosi certa di mesotelioma e di definirne l'istotipo, parametro importante per un approccio terapeutico di tipo chirurgico che sia efficace. Lo scopo di questa ricerca è quello di verificare: a) se vi sono parametri morfologici di diagnosi precoce; b) la loro riproducibilità; c) quale sia la procedura più efficace per una diagnosi precoce; d) quale è l'impatto sulla terapia e sulla sopravvivenza.

Materiale e metodi.

Nel presente studio sono stati riesaminati 1731 casi citologici e 579 biopsie pleuriche chirurgiche in toracotomia minima e in videotoracotomia (VTS) osservati nel periodo 1990 – 2003.

I vetrini citologici sono stati preparati con la sola metodica del cytospin dal 1990 al 1997, mentre dal 1998 si è aggiunto l'uso della citocentrifuga e del citoincluso (cell block) secondo le procedure riassunte nella tavola 1. La risposta citologica dei sedimenti pleurici è stata classificata secondo le categorie diagnostiche usate per altri tumori e divise in 4 grandi categorie (Tav.2) (1). I parametri morfologici applicati alla definizione della citologia dei versamenti sono quelli usuali e descritti in letteratura (2). In caso di dubbio diagnostico tra malignità primitiva o metastatica sono stati usati due marcatori immunoistochimici (calretinina e CEA) con doppia colorazione sul materiale citologico già disponibile e colorato. I preparati citologici sono stati decolorati e poi trattati con metodica immunoistochimica usuale con coloratore automatico.

I preparati istologici delle biopsie pleuriche sono stati colorati con la colorazione base della Ematossilina-Eosina, con il PAS e PAS dopo diastasi per valutare la presenza o meno di mucosecrezione; sono stati testati, con metodica immunoistochimica, anticorpi monoclonali e policlonali presenti in commercio. Alcuni di questi sono considerati essere positivi per il mesotelioma (calretinina, citocheratine 5/6, WT-1(6f-H2), la podoplanina o D2-40), altri sono considerati negativi per il mesotelioma (CEA, proteina B 72.3, MOC 31, Ber-EP4, CD15); a questi classici anticorpi e' stato aggiunto successivamente un nuovo anticorpo negativo per le cellule mesoteliali, la claudina 4, sono stati inoltre testati molecole di proliferazione come il Ki67 e il proto-oncogene C-erb2/HER-2 (clone CB11). In considerazione del fatto che per gli anticorpi anti-calretinina sono presenti in commercio due diversi cloni, sono stati testati entrambi per definire la loro specificità e sensibilità. Tali cloni sono DC8 e 5 A5. Su tutti i casi sono stati testate le pancitocheratine e le citocheratine 8/18 e citocheratina 7. Infine abbiamo valutato la immunoespressione di una molecola, la telomerasi (clone 44F12) che è indicatore di "immortalità della cellula neoplastica. Nelle lesioni iperplastiche o di dubbia malignità istologica sono stati usati i seguenti marcatori: antigene epiteliale di membrana (EMA), la proteina p53 e la desmina. I primi due sono considerati espressi in genere da cellule maligne, la desmina è espressa prevalentemente da cellule reattive iperplastiche. Tutte le colorazioni immunoistochimiche sono state eseguite con coloratore automatico per garantire le medesime condizioni ambientali di sviluppo delle colorazioni e quindi per garantire una elevata riproducibilità dei tests. In 25 casi di mesotelioma, osservati in prevalenza in donne senza apparente esposizione all'amianto abbiamo ricercato la presenza del virus SV40.

Tutti i casi citologici ed istologici sono stati esaminati da 3 patologi separatamente definiti con le lettere A, B, C. Essi hanno esaminato dapprima i preparati citologici e successivamente i preparati istologici colorati con la colorazione base della ematossilina eosina; in una seconda tornata sono stati rivisti a random e in modo autonomo i soli casi istologici completi delle colorazioni immunoistochimiche. I dati inter ed intra-osservatore ottenuti sono stati valutati con il K statistico (tav.3). Laddove possibile, le diagnosi citologiche sono state correlate con le diagnosi istologiche delle biopsie pleuriche.

Una volta definita la diagnosi, si è valutato il rapporto tra l'istotipo del mesotelioma, lo stadio e la sopravvivenza, quest'ultima attinta dai files del Servizio di Oncologia Medica dell'ospedale di Mestre. Nel lungo sopravvivenza (> di 3 anni) sono stati considerati, oltre all'indice di proliferazione determinato con il Ki67/MIB-1, molecole coinvolte nel ciclo cellulare come la proteina p27 e p21, la cicloossigenasi (COX-2) e due fattori di crescita come l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) e il PDGF (platelet derived growth factor) per valutare il loro eventuale ruolo nella sopravvivenza ed eventualmente nel trattamento terapeutico.

Le biopsie pleuriche negative per mesotelioma sono state definite come pleurite cronica in organizzazione o come fibrosi pleurica aspecifica a seconda della cronicità del processo; come placche ialine della pleura; o come iperplasia del mesotelio secondo i criteri istologici definiti dalla letteratura (3). Nelle forme diagnosticate come iperplasia del mesotelio sono stati testati tre anticorpi: l'EMA, l'oncogene p53 e la desmina.

Risultati

Diagnosi citologica dei versamenti. La diagnosi citologica di mesotelioma o di sospetto mesotelioma (categoria diagnostica citologica C4 o C5) è stata posta complessivamente in 83 casi pari al 4.7% del totale dei versamenti pleurici esaminati. Non tutti i casi su cui era stata formulata una diagnosi citologica di probabile o possibile mesotelioma sono stati sottoposti a biopsia chirurgica in gran parte perché le condizioni cliniche non lo consentivano.

Diagnosi istologica su biopsia. La diagnosi istologica di mesotelioma su biopsia pleurica è stata posta in 189 casi, pari al 32.6% del totale delle biopsie pleuriche (579); 64 di questi casi sono stati sottoposti successivamente ad intervento chirurgico di pleuro-pneumectomia o pleurectomia sulla base dell'istotipo definito in biopsia e sui dati clinico-radiologici di operabilità.

Dei 189 pazienti con diagnosi istologica (biopsia toracoscopica) di mesotelioma solo 32 (16.9%) avevano una precedente diagnosi citologica classificata come C5 (cellule maligne compatibili con mesotelioma maligno), mentre nel 32.1% dei restanti casi la diagnosi citologica era definita come C4 (sospetto di malignità) e nel 51.0% la diagnosi era definita come C3 o C2, negatività per cellule neoplastiche. Tali percentuali sono essenzialmente le stesse confrontando le diagnosi citologiche ed istologiche nei due periodi considerati (1990-1997 e 1998-2003) in cui erano state utilizzate metodiche di allestimento dei preparati citologici diverse.

Variabilità diagnostica inter-intraobserver. La variabilità diagnostica intraobserver globale è stata moderata con un K pari a 0.54. La variabilità interobserver tra i tre patologi è risultata buona con un K di 0.82 per la definizione generica di cellule maligne; è stata discreta (K = 0.32) tra patologo A e C per quanto riguarda la definizione citologica C5 laddove si è chiesto di definire le cellule maligne come mesotelioma e moderata (k = 0.44) tra il patologo A e B e il patologo B e C (K = 0.46). La variazione nella definizione della diagnosi definita come C 4 (Sospetto di malignità) ha avuto un K di 0.77 tra i patologi A e C, di 0.53 tra il patologo A e B e di 0.49 tra il patologo B e C.

Nell'approccio diagnostico su biopsia, l'applicazione del panel immunohistochimico ha facilitato la diagnosi di mesotelioma con un k intraobserver variabile tra 0.83 e 0.97 ed un K interobserver variabile tra 0.75 e 0.87. I casi non concordanti sono stati rivisti insieme raggiungendo un accordo nel 97% dei casi; i 6 casi su cui non vi era stata concordanza piena sono stati sottoposti a revisione esterna da parte di esperto del Panel Internazionale dei Mesoteliomi.

Marcatori immunohistochimici. Tra tutti i marcatori usati nella definizione dei mesoteliomi, quelli che si sono dimostrati più specifici e sensibili nel nostro laboratorio con elevata riproducibilità sono:

- a) la calretinina - clone DC8 – È risultato il marcatore più specifico per il mesotelioma risultando positivo nel 100% dei mesoteliomi epitelioidei e nella componente epitelioidea delle forme bifasiche; la positività di questa molecola è tipicamente nucleare e citoplasmatica, la sola colorazione citoplasmatica non è stata considerata utile ai fini diagnostici. La calretinina è risultata essere negativa nelle forme sarcomatose pure di mesotelioma.
- b) La Podoplanina o D2-40 è risultata positiva nel 96% dei casi delle forme epitelioidea e bifasica di mesotelioma con una forte espressione di membrana; nelle forme sarcomatose la podoplanina si è potuta osservare solo focalmente e in modo debole in tre casi.
- c) WT-1 espresso nel 93% dei mesoteliomi epitelioidei con una espressione tipicamente nucleare; non è espresso nelle forme sarcomatose pure.
- d) Citocheratina 5/6 risulta essere espressa nel 98% dei mesoteliomi epitelioidei; non espressa nei mesoteliomi sarcomatoidi.
- e) CEA Monoclonale, sempre negativo nei mesoteliomi
- f) MOC-31, anche questa molecola è risultata essere sempre negativa in tutte le varianti istologiche di mesotelioma
- g) Ber-EP-4, negativo nei mesoteliomi
- h) Proteina B72.3, ha mostrato una lieve e focale positività nel 2% dei mesoteliomi epiteliali.

Tutti questi marcatori si sono rilevati importantissimi nella diagnosi differenziale tra mesotelioma epitelioideo e bifasico e metastasi pleurica di adenocarcinoma, mentre non si sono dimostrati utili nella diagnosi di mesotelioma sarcomatoide, il quale peraltro si caratterizza per una marcata e diffusa positività alle citocheratine 8-18, mai presente in sarcomi primitivi o secondari della pleura che esprimono marcatori specifici della linea differenziativa neoplastica loro specifica.

Iperplasia mesoteliale. Le 390 biopsie negative per mesotelioma sono state classificate come pleurite cronica in organizzazione (177 casi); come fibrosi pleurica aspecifica (131 casi); placche ialine della pleura (42 casi); solo iperplasia reattiva del mesotelio (30 casi); iperplasia atipica del mesotelio (10 casi). Quest'ultima entità in particolare è stata definita morfologicamente in base alla presenza di micropapille prive di asse stromale, poco

coese, con tendenza al distacco delle cellule e presenza di edema stroma. In 8 dei 10 casi definiti come iperplasia atipica vi era espressione citoplasmatica dell'EMA e nucleare del protooncogene p53, mentre negativa era la reazione alla desmina. Questo profilo immunoistochimico associato alla presenza di atipie strutturali, in assenza di infiltrazione stromale, ci ha fatto porre diagnosi di proliferazione mesoteliale atipica versus mesotelioma in situ. Degli 8 casi di proliferazione atipica del mesotelio, 5 sono stati sottoposti a seconda biopsia in videotoractomia che ha portato alla diagnosi di mesotelioma epiteliodeo in 4 casi, sottoposti successivamente ad intervento chirurgico di peluropneumectomia extrapleurica; in 1 caso la seconda biopsia ha mostrato un chiaro aspetto di pleurite fibrinosa con marcata iperplasia, escludendo quindi la possibilità di mesotelioma, dato questo confermato dal follow-up che vede il paziente in buone condizioni di salute a distanza di 7 anni. In 3 casi non vi sono stati accertamenti ulteriori e non si hanno notizie del follow-up.

Negli altri 32 casi, di cui 30 definiti, con la sola morfologia, come iperplasia reattiva del mesotelio e 2 come iperplasia atipica del mesotelio, il profilo immunoistochimico vedeva una positività citoplasmatica della sola desmina in 29 casi; in 3 casi vi era la contemporanea espressione della desmina e dell'EMA. Tutti sono stati considerati nell'ambito di processo infiammatorio con reazione iperplastica del mesotelio.

Stadiazione e Follow-up: la sopravvivenza media dei mesoteliomi pleurici studiati, indipendentemente dal loro stadio e dalla morfologia è di 10 mesi. In 12 casi (6.2%) la sopravvivenza è stata di oltre 3 anni dalla diagnosi. Questi casi a lunga sopravvivenza erano mesoteliomi epiteliodei e tutti, ad eccezione di 3 casi, sottoposti ad intervento chirurgico.

La stadiazione clinica o patologica non è stata definita nel 26.7 dei casi nel restante 73.3 dei mesoteliomi essi si trovavano al momento della diagnosi in uno stadio 1 nel 7.8% dei casi; in uno stadio 2 nel 40.6%; in stadio 3 nel 18.7% e in stadio 4 nel 6.2%.

Fattori Prognostici. Dei diversi fattori prognostici testati (Ki67, p53, p27, p21, COX-2, EGFR, PDWFR) solo il Ki67 e i fattori di crescita sembrano avere un qualche significato prognostico. La immunoreattività per il Ki67 è significativamente diversa tra forme epiteliali e bifasiche o sarcomatose e nei casi a bassa sopravvivenza. I fattori di crescita testati hanno espressione diversa nei casi a lunga sopravvivenza (oltre 3 anni) rispetto a quelli con sopravvivenza usuale (8-10 mesi). In particolare si è potuto osservare che nei 12 casi con sopravvivenza superiore a 3 anni tutti di tipo epiteliodeo ed operati di pleuropneumectomia extrapleurica o di pleurodesi con talcaggio, esprimevano l'EGFR, mentre quelli a sopravvivenza usuale, sia epiteliale che bifasici, esprimevano il PDWFR. Queste molecole sono espresse focalmente sia in lesioni reattive che atipiche del mesotelio.

SV40: i casi testati per il virus SV40 secondo la metodica descritta da Carbone e coll. sono risultati tutti negativi.

Commento

Dall'insieme dei parametri studiati si ricava quanto segue:

Diagnosi citologica dei versamenti: la diagnosi citologica di mesotelioma dei versamenti ha una bassa sensibilità ed una discreta specificità; la introduzione dell'esame su citoincluso non ha migliorato la sensibilità diagnostica in senso benigno/maligno delle lesioni primitive della pleura; tale metodica ha però consentito una maggior precisione nel differenziare il mesotelioma dalle metastasi pleuriche (adenocarcinoma, melanoma ecc) evitando in questo modo ulteriori indagini invasive diagnostiche. L'applicazione delle immunoistochimiche migliora sensibilmente la capacità di diagnosi differenziale tra lesione metastatica alla pleura e mesotelioma. La diagnosi citologica dei versamenti in soggetti con mesotelioma bifasico o sarcomatoide non si è dimostrata utile, con una sensibilità di poco superiore al 2%.

L'applicazione di marcatori tipo EMA o p53 e desmina per differenziare le cellule mesoteliali benigne da quelle atipiche non ha dato risultati attendibili essendo espressi in citologia in modo irregolare e parziale.

Se l'esame citologico dei versamenti non si è rilevato utile nella diagnosi precoce, ha invece mostrato una buona attendibilità nella valutazione delle recidive nei soggetti sottoposti ad intervento chirurgico o nel valutare la progressione della malattia (esame citologico del versamento pleura contro-laterale, del pericardio o del peritoneo) evitando inutili interventi chirurgici diagnostici.

Diagnosi istologica su biopsia. L'esame istologico dei campioni biopsici ottenuti in videotoracosopia (VTS) risulta essere il gold standard diagnostico di mesotelioma come dimostrato anche dall'elevata riproducibilità diagnostica inter ed intraobserver. L'utilizzo corretto del materiale ha permesso di classificare i mesoteliomi nelle sue tre grandi categorie (epiteliodeo, bifasico e sarcomatoso) ma ha anche permesso di definire le subcategorie morfologiche delle forme epiteliodee e sarcomatose, anche se queste non rivestono alcun significato da un punto di vista prognostico. Si è potuto inoltre diagnosticare una forma rara di mesotelioma, il mesotelioma papillare ben differenziato che si associa a lunghissima sopravvivenza, e di evidenziare aspetti morfologici di mesotelioma inizialmente infiltrante e di proliferazione atipica del mesotelio o di "mesotelioma in situ" che ha consentito un approccio terapeutico chirurgico adeguato con sopravvivenze, nei pochi casi registrati, superiori ai 3 anni.

La biopsia chirurgica in VTS ha permesso una agevole applicazione delle colorazioni immunoistochimiche con ripercussioni positive sulla definizione corretta del mesotelioma.

Nei casi definiti come proliferazione atipica del mesotelio/mesotelioma in situ, la correlazione con il quadro radiologico TAC ha permesso di selezionare pazienti per una seconda biopsia o per l'intervento di pleuropneumonectomia, in questi casi si è proceduto in sede intra-operatoria ad esame di materiale congelato per definire la natura maligna del processo.

Infine l'esecuzione di biopsie multiple di pleura, possibilmente in sedi diverse, ha aumentato in modo significativo la sensibilità diagnostica istologica di mesotelioma; l'utilizzo di biopsie con ago tranciante transtoracico ha mostrato dei limiti nella definizione della reale infiltrazione stromale e nella applicazione delle metodiche immunoistochimiche per gli artefatti da campionamento che determinano spesso uno schiacciamento delle cellule, alterandone la morfologia e le caratteristiche immunoistochimiche.

Marcatori immunoistochimici . di tutti i marcatori usati nel nostro laboratorio, quelli che si sono dimostrati utili ed affidabili per la riproducibilità delle reazioni sono stati descritti nel paragrafo dei risultati. Ciò ci ha portato ad utilizzare nella routine diagnostica del mesotelioma pleurico l'uso contemporaneo di tre marcatori "positivi" per il mesotelioma (calretinina, clone DC8, il D2-40 e il WT-1) e tre marcatori negativi per il mesotelioma (CEA monoclonale, il MOC31 e il Ber-EP4). Le citocheratine 5/6, pur essendo positive nel 98% dei mesoteliomi, sono espresse anche dal carcinoma squamocellulare per cui si è deciso di sostituirlo con il D2-40. Nel caso di mesotelioma peritoneale invece le citocheratine 5/6 sono usate in sostituzione del WT-1 e questo soprattutto in caso di dubbio mesotelioma peritoneale insorto in donne poiché il WT-1 è espresso anche dal carcinoma ovario sieroso.

Nelle forme iperplastiche si utilizza routinariamente l'EMA, la p53 e la desmina; in presenza di forte espressione di EMA e di p53 si suggerisce la diagnosi di proliferazione mesoteliale atipica con indicazione a seconda biopsia quando il quadro clinico e soprattutto radiologico sono suggestivi per mesotelioma. In questi casi i campionamenti biotipici vengono selezionati con l'aiuto di esame istologico intraoperatorio che consente di valutare la congruità del campionamento biotipico ai fini di una diagnosi di certezza.

Fattori Prognostici: Per quanto concerne i marcatori prognostici, questi hanno dato informazioni contraddittorie e necessitano ulteriori indagini sebbene l'espressione dell'EGFR sembri associarsi a miglior prognosi, mentre un indice proliferativo, valutato con Ki67, superiore al 30% e la espressione del PDGFR sembrano associarsi a prognosi severa. Sono dati questi da verificare su una casistica più ampia.

Punti chiave

- L'esame citologico dei versamenti e le biopsie con ago tranciante a cielo coperto hanno una bassa sensibilità diagnostica per il mesotelioma, ma sono importanti come prima tappa diagnostica in termini di diagnosi differenziale verso l'adenocarcinoma o altri tumori diversi dal mesotelioma
- La biopsia in videotoracosopia o la biopsia chirurgica rappresentano il gold standard diagnostico nel mesotelioma
- Il patologo dovrebbe definire sempre l'istotipo del mesotelioma
- Il ricorso all'immunoistochimica deve essere appropriato (vedi indicazioni pratiche all'approccio diagnostico)

Indicazioni ad un approccio pratico alla diagnosi precoce di mesotelioma

In considerazione del fatto che non vi sono parametri cito-istologici che consentano di definire con certezza la diagnosi di mesotelioma in una fase molto precoce del processo si suggeriscono le seguenti procedure che si sono rivelate utili a ridurre i tempi di diagnosi morfologica in soggetto con sospetto clinico e radiologico di mesotelioma, consentendo ad un numero sempre maggiore un corretto approccio terapeutico chirurgico di pleuropneumonectomia extrapleurica, evitando interventi sostanzialmente inutili e pesanti per il paziente. Le procedure di seguito illustrate si sono rivelate utili anche nel follow-up di pazienti trattati con cicli di chemioterapia.

Diagnosi citologica dei versamenti.

- 1- Metodo di preparazione indifferente (cytospin, citocentrifuga o strato sottile); si usi quello con cui si ha maggior confidenza.
- 2- Allestire almeno 6 preparati citologici da colorarsi con Papanicolaou o con Ematossilina eosina, con May Grunwald- Giemsa (MGG) ed eventualmente con metodica immunoistochimica (un marker per mesotelio ed uno per adenocarcinoma) nei casi di citologia maligna o probabile maligna.
- 3- L'uso dei marcatori immunoistochimici va limitato alla sola esclusione di metastasi pleurica e non alla definizione di malignità del versamento in quanto non affidabile.

- 4- Utilizzare, preferibilmente, le categorie diagnostiche definite per altri carcinomi al fine di omogeneizzare le diagnosi anche ai fini di valutazioni medico-legali o di inserimento nel registro Regionale dei Mesoteliomi qualora non vi sia disponibilità di diagnosi istologica (tav 2).
- 5- In caso di citologia in categoria C4 valutare aspetto radiologico TAC e produrre eventualmente una diagnosi multidisciplinare cito-radiologica
- 6- In caso di negatività ripetuta 2 o 3 volte dell'esame citologico del versamento e in presenza di un aspetto radiologico TAC di neoplasia pleurica, è opportuno procedere a biopsia in VTS per ridurre i tempi di diagnosi ed evitare il rischio che la neoplasia si estenda al tramite dell'ago di toracentesi.

Diagnosi istologica su biopsia in VTS

- 1- Privilegiare l'utilizzo di biopsie in VTS da eseguirsi in centri attrezzati e di riferimento in cui vi sono operatori esperti
- 2- Evitare le biopsie con ago tranciante trans-toracico. L'uso di tale metodica va riservata solamente in caso di impossibilità di intervento chirurgico in VTS
- 3- I campioni biotici devono essere multipli ed eseguiti in zone diverse sia sulla pleura parietale che viscerale. Per una resa diagnostica massima le sedi di campionamento devono essere eseguite su aree macroscopicamente patologiche (l'esperienza dell'operatore è in questi casi fondamentale) e non effettuate a random.
- 4- In caso di dubbio è preferibile inviare per esame intraoperatorio alcuni campioni biotici per definire il tipo di processo patologico pelurico il che consente di ridurre il rischio di campionamento inadeguato (spesso riscontrato in passato o quando il campionamento è eseguito in centri con scarsa esperienza non specifica) e quindi la necessità di un secondo intervento.
- 5- Il materiale biotico va inviato immediatamente al laboratorio di Anatomia Patologica a fresco. Ciò consente di selezionare i campioni biotici da congelare per eventuali studi molecolari.
- 6- I campioni biotici, fissati opportunamente in formalina, vanno orientati per una corretta valutazione della eventuale infiltrazione.
- 7- Le sezioni vanno colorate con Ematossilina Eosina e contemporaneamente, in caso di sospetto clinico di mesotelioma, vanno colorate con almeno due marcatori "positivi" e due "negativi".
- 8- In caso di mesotelioma, va definita sempre la variante morfologica (epitelioide, bifasica o sarcomatoide) in quanto consente di selezionare l'eventuale candidato all'intervento chirurgico.
- 9- Nel referto istologico vanno sempre indicati gli anticorpi usati e il tipo di colorazione espressa.
- 10- Nella risposta istologica va sempre indicata la presenza di infiltrazione della parete toracica (tessuto muscolare ecc) in quanto la sua presenza tende ad escludere il ricorso a terapia chirurgica demolitivi.
- 11- In caso di processo di iperplasia del mesotelio con atipie strutturali dubbie, usare il termine di "Proliferazione atipica del mesotelio". Utile, ma non diagnostico, l'uso contemporaneo di p53, EMA e desmina per la definizione di tali lesioni.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 931/04/99

Responsabile Scientifico Naccarato Remo - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Utilizzo della matrice acellulare nel ripopolamento del fegato con epatociti isolati. Aspetti biologici e prospettive cliniche nel trapianto di fegato”.

Questo studio ha permesso di confermare l'utilità della matrice acellulare omologa come base biologica per la vitalità cellulare e per il mantenimento delle funzioni metaboliche di epatociti in un modello sperimentale animale. L'applicazione di questa metodica rientra tra le procedure alternative al trapianto di fegato in toto.

La matrice acellulare omologa si è dimostrata nel nostro studio essere un valido supporto per la coltura degli epatociti. Per effettuare questo studio il primo requisito è stato ottenere delle sezioni di matrice completamente acellulari. La verifica della acellularità è stata effettuata su campioni scelti in modo casuale tra le sezioni preparate, tramite valutazione istologica (colorazione ematossilina-eosina). In ogni singolo controllo effettuato su tutta la superficie del campione non vi è mai stata evidenza della presenza di epatociti o di altre cellule, che ha confermato la validità del metodo impiegato per rendere la matrice acellulare.

È indispensabile isolare epatociti non contaminati da altre cellule. I metodi comunemente impiegati per isolare le popolazioni cellulari epatiche sono numerosi e offrono rese diverse. Le metodiche attualmente impiegate per la separazione di epatociti dal fegato si basano sulla perfusione dell'organo con soluzioni enzimatiche. Gli enzimi usati sono: collagenasi con vari gradi di purezza, pronasi e enterotossina anche in associazione durante la perfusione e/o l'incubazione. I protocolli differiscono anche per la temperatura delle soluzioni usate. Le alternative

proposte prevedono l'utilizzo di temperature intorno ai 37° C per massimizzare l'attività enzimatica ma anche basse temperature (<8°C).

Per il nostro studio serviva un protocollo in grado di fornire una popolazione cellulare composta principalmente da un elevato numero di epatociti con alta vitalità. Il protocollo più adatto a questo studio è risultato essere quello che prevedeva l'utilizzo di collagenasi a 37°C durante la perfusione e l'incubazione ma vi è stata apportata una modifica rappresentata da un breve (10 min.) passaggio in ghiaccio al fine di bloccare l'attività enzimatica della collagenasi.

Le cellule così ottenute sono costituite da epatociti e da una frazione non parenchimale. La separazione degli epatociti dalle altre linee cellulari è avvenuta con una centrifugazione differenziale a bassa temperatura e velocità sfruttando, in questo modo, una separazione basata sulle diverse dimensioni delle cellule. Gli epatociti hanno dimensioni e densità maggiori rispetto a tutte le altre cellule e quindi più facilmente depositano. Un'ulteriore conferma della presenza di epatociti è stata fornita dall'indagine immunoistochimica per l'albumina. Sono state rilevate cellule che per il 95% risultavano positive alla colorazione immunoistochimica.

Il saggio di vitalità cellulare con 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolobromuro noto come MTT, è stato proposto per la prima volta da Mosmann nel 1983 (19), ed ora è ampiamente utilizzato in molti laboratori. La riduzione dell' MTT è effettuata solo da cellule metabolicamente attive e quindi vitali. Il saggio dell' MTT misura in modo indiretto la vitalità cellulare, essendo quest' ultima dipendente da due fattori: il numero assoluto delle cellule vive ma anche dallo stato metabolico delle cellule stesse: una cellula metabolicamente attiva riduce una quantità di colorante maggiore rispetto ad una cellula metabolicamente meno attiva.

I risultati della vitalità nel loro complesso dimostrano che il polistirene è un supporto insufficiente per una coltura epatocitaria: in effetti già dal 5° giorno, la totalità delle cellule non sono più vitali. Sulla matrice e sul collagene invece si nota che la vitalità cellulare è presente per tutta la durata dello studio, registrando comunque una diminuzione con il passare del tempo. La vitalità su matrice risulta superiore al collagene 4 giorni su 5, che indica come il supporto per la coltura di epatociti costituito da matrice acellulare omologa sia da preferire al collagene.

La validità della matrice rispetto al collagene viene ulteriormente confermata dall'analisi dei dati riguardanti le concentrazioni dell'albumina nel terreno esausto. L'albumina è una proteina sintetizzata esclusivamente dalle cellule epatiche ed è stata utilizzata come indice di funzionalità delle colture cellulari. Va tenuto conto che la presenza di albumina nel terreno è riconducibile alla sintesi e secrezione attiva della proteina dalle cellule stesse ma anche al rilascio passivo di albumina pre-sintetizzata nel terreno a seguito di lisi delle cellule. Il 1° giorno infatti, i livelli di albumina rilevati nel terreno esausto delle semine su polistirene e su matrice non differiscono in modo significativo, mentre la matrice si dimostra significativamente superiore rispetto al collagene. Questo risultato, visto anche alla luce dell'andamento della vitalità nello stesso periodo, ci induce a supporre che il valore elevato riferito al polistirene sia stato causato dalla lisi cellulare piuttosto che da un'elevata attività sintetica degli epatociti.

Il 5° giorno è distinto da un marcato calo nei livelli di albumina su polistirene mentre sul collagene si misura addirittura un piccolo, ma apprezzabile aumento di questo valore.

Questo fenomeno si presenta in lieve posticipo rispetto al leggero aumento della vitalità cellulare registrato tra 1° e 3° giorno per il collagene. Tale sequenza temporale solleva l'ipotesi che nella coltura cellulare prima si stabilizza la vitalità cellulare e successivamente si nota un aumento della produzione di albumina, processo dispendioso dal punto di vista energetico e metabolico. Il 7° giorno l'albumina non è rilevabile sul surnatante del polistirene così come il 9° giorno. La situazione registrata per la matrice è esattamente opposta: la concentrazione di albumina tra il 5° e 7° giorno risulta in apprezzabile aumento, riportandosi al livello del 3° giorno, accompagnata dal corrispondente aumento della vitalità rilevato durante lo stesso periodo. In questo caso esisterebbe quindi un contemporaneo aumento di vitalità e attività di sintesi. La matrice dimostra una presenza di albumina significativamente superiore per 4 giorni su 5, mentre a sua volta il collagene risulta superiore in modo significativo rispetto al polistirene per 3 giorni su 5. Gli epatociti quindi necessitano della matrice od almeno del collagene per sopravvivere ma anche per essere attivi dal punto di vista metabolico e quindi utilizzabili per un innesto trapiantabile. Questa conclusione viene ulteriormente rafforzata dai risultati ottenuti con la microscopia elettronica a scansione. Dalle fotografie ottenute si può apprezzare la forma delle cellule, la loro reciproca disposizione, la presenza o meno di punti di fusione, che sono indicazioni importanti per lo stato di differenziazione e quindi di funzionalità delle cellule stesse. Gli epatociti seminati sui diversi supporti dimostrano aspetti diversi: le cellule sul collagene mantengono una forma sferoidale però non dimostrano la formazione di aggregati veri e propri, il contatto reciproco è scarso o nullo. Gli epatociti invece seminati su polistirene condizionato con collagene manifestano un maggior grado di contatto reciproco e a volte dimostrano segni di fusione, ma presto perdono la loro forma sferoidale, emettono dei prolungamenti simili a pseudopodi e si appiattiscono. Le immagini ottenute dalle semine su matrice mostrano invece la formazione di aggregati (clusters), costituiti da cellule sferoidali in stretto contatto tra loro che dal 3° giorno in poi mostrano anche punti di fusione.

Gli aggregati si collocano preferibilmente in depressioni della matrice con cui si trovano in stretto contatto. Tramite questa tecnica è stato possibile evidenziare dei clusters di epatociti anche a 12 giorni dalla semina su matrice.

Per quanto riguarda l'impianto in vivo non siamo in grado di fornire dei dati sufficientemente significativi. I principali motivi che hanno limitato la riuscita dell'impianto sono stati principalmente l'alta invasività dell'intervento e il postoperatorio. La maggior parte dei ratti (6 su 10) non è riuscita a superare l'intervento (2 sono deceduti durante l'intervento probabilmente per il carico anestetico; 4 non sono sopravvissuti più di 24 ore dall'innesto). Solo 4 su 10 hanno superato le 24 ore dall'intervento ma sono comunque decedute per le complicanze operatorie (infezioni...). I pochi dati ottenuti non sono stati quindi sufficienti per formulare un risultato statisticamente significativo.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 932/02/99

Responsabile Scientifico Nardelli Giovanni - Ente Proponente Università di Padova

“Diagnostica ecografica avanzata in ginecologia oncologica (Ecografia digitale tridimensionale color-power-doppler transvaginale dell'endometrio ed ovaio)”.

Il Progetto di Ricerca ha sviluppato la Diagnosi Precoce dei Tumori dell'Endometrio e dell'Ovaio sia in termini diagnostici che di cultura della prevenzione al personale medico e non della Regione Veneto, poiché il problema principale risiede nella natura asintomatica del tumore endometriale ed ovarico in fase iniziale.

I tumori dell'endometrio sono più frequenti nelle donne in postmenopausa e presentano una five-yrs survival rate dell'83%. L'incidenza di pazienti con una seconda primitiva neoplasia maligna è del 10.5% nei carcinomi endometriali e del 9.0% nei carcinomi ovarici (Shiromizu).

I tumori dell'ovaio rappresentano il 5% di tutti i tumori ginecologici ma hanno un five-yrs survival rate del 42%.

Nelle famiglie che hanno presentato tumori della mammella e dell'ovaio, è stata identificata una predisposizione genetica dovuta a mutazione in BRCA 1 o BRCA 2 nel 30 % (31/104) dei casi (Ligtenberg)². La maggioranza di queste mutazioni erano a carico di BRCA I. Le mutazioni sono state identificate in 15/25 famiglie che presentavano entrambi i tumori mammario ed ovarico, ed in 16/79 famiglie che presentavano soltanto un tumore mammario.

I Tumori diploidi sono associati a minori recidive rispetto ai tumori aneuploidi o tetraploidi, pertanto alcuni oncogeni (EGF-R), (HER-2/neu-p185), (Mib-1-Ki-67), (Bax), (Bcl-2), (Ki-ras), (p-53) giocano un ruolo nella genesi e nella naturale progressione dei tumori endometriali ed ovarici (Kuhn, Lemon, Van Nostrand, Ishihara).

L'attenzione è stata rivolta all'endometrio ed all'ovaio non casualmente e non come organi a sé stanti.

L'evoluzione oncologica, infatti, è uscita dai confini della "PATOLOGIA D'ORGANO" ed è entrata nella più ampia visione della "PATOLOGIA D'ORGANISMO". Il concetto di "familiarità" (Goldberg) è stato modificato dalle attuali conoscenze genetiche allorché le mutazioni di singoli geni possono coinvolgere più organi contemporaneamente. Ecco quindi che l'exeresi della neoplasia primitiva non corrisponde alla rimozione del gene-mutato e, pertanto, l'attesa della metastasi e/o ripresa di malattia e/o di recidiva e/o di seconda/altra neoplasia è realistica e persiste l'incubo dell'overall survival.

Questi casi devono essere però distinti dalle colonizzazioni dirette che i tumori ovarici possono indurre per trasporto di materiale fluido attraverso le tube, all'interno dell'utero. E' stato dimostrato, infatti, che in 128/210 (61%) pazienti con tumore ovarico, che presentavano una citologia peritoneale positiva (Lurain), /128 (42,2%) avevano anche una citologia endometriale positiva; da qui la possibilità di far derivare una diagnosi di tumore ovarico da una citologia endometriale (Jobo).

Una condizione analoga è rappresentata dall'endometriosi: Erzen riporta che su 796 casi di endometriosi ovarica il 4.5% (36 casi) erano complicati da cancro ovarico e, viceversa, su 216 casi di cancro ovarico il 16.7% (36 casi) erano associati ad endometriosi.

E'pertanto interessante l'esperienza di Menkiszak che, avendo studiato 238 famiglie con 258 casi di tumore ovarico, ed avendo effettuato uno screening con BRCA1 - Test, ha diagnosticato un cancro ovarico in 16 famiglie (6,84%) ed una sindrome di cancro mammella-ovaio nell'11,54%. 124 donne-membri di 116 famiglie con DIAGNOSI di PREDISPOSIZIONE EREDITARIA per cancro ovarico sono quindi state studiate per TUMORE ASINTOMATICO con Ecografia Transvaginale e CA 125 ogni 6 mesi, dall'età di 20-25 anni. Al momento attuale, tale studio ha consentito di identificare 5 casi di cistoadenoma sieroso benigno, 3 casi di cistoadenoma maligno borderline ed 1 caso di cistoadenocarcinoma sieroso.

Inoltre è verosimile che la mutazione di un singolo gene possa, nella progressione della malattia, coinvolgere altri siti genici: Ioakim-Liossi riporta l'esito della mappa cromosomica eseguita su 15 fluidi di 11 pazienti affetti da

tumore della mammella e da 27 liquidi ascitici provenienti da 16 pazienti con tumore ovarico. Sono stati osservati aberrazioni numeriche e strutturali dei cromosomi 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 17.

La mutazione genica e la successiva neoplasia ovarica può manifestarsi anche in adolescenti, dove l'ausilio dell'ecografia è fondamentale per il management.

L'impiego dell'Ecotomografia Digitale Bi-Tridimensionale con Color-Power Doppler Transvaginale consente di studiare la morfologia ovarica nella sua cinetica ormonale spontanea e/o indotta (ovulazioni, induzioni, contracccezione, etc) rilevando dalle piccolissime calcificazioni psmmomatose alle strutture cistiche/solide/miste, eliminando i così detti " tumori occulti" (Benjamin) ed orientando il decision-making.

L'End-point del Progetto di Ricerca è stato quello di cogliere il Ruolo dell'ECOGRAFIA negli Stadi Ia e Ib dei Tumori Ovarici ed Endometriali e nei Tumori dell'Ovaio.

L'Ecografia è già di per se un metodo affidabile per identificare gli stadi iniziali (Karlan) di queste neoplasie e può essere utilizzata per ridurre le diagnosi degli stadi avanzati.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 933/02/99

Responsabile Scientifico Oliani Cristina - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Verona

“Diagnosi e sorveglianza dei carcinomi ereditari e del colonretto non poliposici: verifica delle linee guida di Bethesda”.

In questi due anni del Progetto Regionale abbiamo potenziato l'iter diagnostico per le famiglie con sospetta Sindrome di Lynch. Fino ad oggi sono state studiate 51 famiglie. Di queste, 6 non hanno presentato all'analisi del pedigree caratteristiche suggestive di una predisposizione ereditaria; pertanto non sono state avviate all'analisi molecolare e le famiglie hanno ricevuto spiegazioni riguardo la prevenzione secondo il rischio rilevabile nella popolazione generale. In otto casi si è posta diagnosi clinica di poliposi, tipica o attenuata. Trentadue famiglie hanno invece presentato un albero genealogico compatibile con la diagnosi clinica di Sindrome di Lynch. In sei casi la familiarità risultava atipica non rientrando nei Criteri di Amsterdam. Ad oggi in sei famiglie sono state identificate le anomalie genetiche alla base della predisposizione ed è stato avviato lo screening nei familiari di primo grado. Il totale degli individui a rischio su base genetica è di circa 400.

Per quanto riguarda la possibilità di identificare familiarità mediante i Criteri di Bethesda, abbiamo condotto l'analisi dell'instabilità dei microsatelliti su 138 neoplasie del colon retto diagnosticate e sottoposte ad intervento nell'anno 1996, i cui dati sono inseriti nel Registro Tumori Patologia Coloretale dell'Azienda Ospedaliera di Verona. Grazie alla messa a punto di una metodica che utilizza la microdissezione delle sezioni ricavate da materiale paraffinato è stata possibile la distinzione tra il tessuto normale e quello neoplastico. Con questo accorgimento è stato dimostrato un aumento di specificità di questo tipo di analisi anche se richiede la collaborazione di un anatomico-patologo esperto e dedicato alla procedura. L'amplificazione del DNA estratto dal materiale cellulare isolato è stata poi analizzata mediante una tecnologia innovativa che utilizza marcature al fluorocromo al posto del sistema di rivelazione a base di radioattivo. La possibilità di ricorrere a metodiche di indubbio vantaggio dal punto di vista della protezione sanitaria aumentando contemporaneamente la sensibilità del test è dovuta all'utilizzo del sequenziatore, strumentazione all'avanguardia acquisita dal laboratorio di Biologia Molecolare diretto dal Prof. Scarpa poco prima dell'inizio di questo progetto.

Tale metodica ci ha consentito di rilevare 11 tumori con instabilità dei microsatelliti (8%) risultato concorde con i dati riportati in letteratura. In seguito sono stati selezionati dai dati del Registro CRC i casi corrispondenti ai criteri di selezione delle linee guida di Bethesda che sono risultati essere 8. Confrontando neoplasie risultate instabili con la selezione fatta si è potuto evidenziare in 5 casi una concordanza. Quattro pazienti sono risultati candidati al test dell'instabilità dei microsatelliti secondo i criteri selettivi ma non hanno mostrato alcuna instabilità ed infine 6 tumori sono risultati instabili senza però aderire alle indicazioni del Gruppo di Bethesda.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Il Gruppo Multidisciplinare per lo studio delle predisposizioni ereditarie al CRC dalla sua costituzione ufficiale nel marzo '98 ha visto un aumento della richiesta delle sue prestazioni. Tali richieste vengono sempre più da Strutture Sanitarie anche al di fuori della provincia di Verona.

L'attività del Gruppo di Studio ha permesso in questi anni di verificare la fattibilità del percorso di identificazione di individui predisposti geneticamente allo sviluppo di carcinoma coloretale mediante l'ottimale integrazione di dati clinici e di parametri molecolari, ottenibile soltanto in una struttura di tipo multidisciplinare.

Nella nostra attuale esperienza è stato possibile individuare la mutazione alla base della predisposizione ereditaria in un certo numero di famiglie mirando quindi gli interventi sanitari di prevenzione nei gene-carriers. Nelle

famiglie nelle quali non è stata trovata alcuna alterazione nei geni finora conosciuti; tuttavia sono stati dati consigli per una sorveglianza nei parenti di primo grado degli affetti secondo il rischio clinico.

La sorveglianza attuata negli individui a rischio ha finora permesso di diagnosticare in 14 casi dei polipi asportati endoscopicamente. Dei 22 polipi analizzati venti si sono rivelati essere di tipo adenomatoso con diverso grado di displasia; due erano polipi cancerizzati. In tre casi sono stati trovati carcinomi coloretali due dei quali in stadio operabile.

Per quanto riguarda l'obiettivo di sensibilizzazione su tale problematica è stata organizzata una giornata per le scuole di specializzazione affrontando tutte le problematiche concernenti la familiarità dei carcinomi coloretali. La sensibilizzazione della popolazione dei medici sul territorio è stata attuata con un articolo sul Notiziario della Lega per la Lotta contro i Tumori di Verona e con una pubblicazione sulla rivista dell'Ordine dei Medici di Verona (Verona Medica).

Anche grazie al suo impegno in questo progetto il Gruppo di Verona ha organizzato il Congresso Nazionale "Problematiche Cliniche e Molecolari delle Neoplasie Ereditarie del Colon retto, della Mammella e dell'Ovaio".

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 934/02/99

Responsabile Scientifico Padrini Roberto - Ente Proponente Università di Padova

“Monitoraggio dei livelli plasmatici del 5 fluoro uragile (bolo E.V.) in pazienti con neoplasia del tratto gastroenterico: correlazione con la risposta clinica e la tossicità”.

La ricerca, iniziata nel giugno del 2000, ha concluso la fase di arruolamento dei pazienti e sta completando il follow-up previsto di 1-2 anni, necessario per valutare l'impatto del trattamento adiuvante con 5-fluorouracile sulla frequenza di recidive del tumore di colon-retto e sulla sopravvivenza. Il numero di pazienti che realmente hanno partecipato allo studio (70) è leggermente superiore a quello preventivato sulla base di calcoli statistici (61) in quanto è presumibile che alcuni pazienti non completeranno (per scelta spontanea) tutte le fasi dello studio. I risultati finora conseguiti sono stati oggetto di una comunicazione a un congresso nazionale, una comunicazione a un congresso internazionale e due pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali di ambito farmacologico-clinico (vedi materiale allegato: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) e hanno permesso di dare una risposta a tre quesiti riguardanti l'uso clinico del 5-fluorouracile nella terapia adiuvante del tumore del colon-retto:

1. E' possibile determinare la dose iniziale del farmaco usando un metodo meno impreciso di quello basato sulla superficie corporea del paziente?
2. Quali sono le concentrazioni plasmatiche di farmaco associate a tossicità grave?
3. Quante misurazioni della concentrazione plasmatica (prelievi di sangue) sono necessarie per calcolare accuratamente l'area sotto la curva delle concentrazioni nel tempo (AUC)?

Quesito 1

I nostri studi pubblicati sulla rivista British Journal of Clinical Pharmacology (Gusella M., Toso S., Terrazzi E., Ferrari M., Padrini R., Relationship between body composition parameters and fluorouracil pharmacokinetics. Br J Clin Pharmacol 2002) hanno dimostrato che la misurazione della massa corporea magra e dell'acqua corporea totale con un metodo non invasivo (analisi dell'impedenza bioelettrica) consente di prevedere la capacità dell'organismo di eliminare il farmaco più accuratamente dei parametri antropometrici usuali (peso corporeo e superficie corporea) e che il sesso femminile ha una capacità di eliminazione superiore al sesso maschile. Le equazioni ricavate dai dati sperimentali consentono di calcolare la dose di farmaco necessaria per raggiungere un valore ottimale predefinito di concentrazione plasmatica.

Quesito 2

La concentrazione ottimale è quella che produce il maggiore effetto terapeutico con i minori effetti tossici. Attualmente disponiamo solamente dei dati relativi agli effetti tossici e, poiché la loro elaborazione richiede tempo, è stata completata per ora su 56 cicli di terapia. Basandosi su questi risultati parziali è possibile individuare un valore di AUC di 575 mg/L x min che separa con una sensibilità del 79% e una specificità del 72% i cicli con tossicità da quelli senza tossicità. Quando sarà completata l'analisi su tutti i dati disponibili (circa 180 cicli di terapia) la stima di questo cut-off sarà più affidabile e il suo valore potrà essere utilizzato come riferimento per adattare la posologia del farmaco a posteriori. L'utilità di questo approccio è particolarmente evidente nei pazienti che non presentano grave tossicità da chemioterapia e che hanno valori bassi di AUC, nei quali un aumento della dose, guidato dal monitoraggio dei livelli plasmatici, potrebbe conseguire benefici terapeutici aggiuntivi. Questi risultati sono stati presentati al Congresso della Società Italiana di Farmacologia del 2001 (Genova 30 maggio- 2 giugno).

Quesito 3

Quando sarà definito il valore "target" di AUC con sufficiente precisione, si porrà il problema di verificare il suo raggiungimento nei singoli pazienti mediante monitoraggio terapeutico. Nell'applicazione di routine questa tecnica esige la massima semplificazione possibile. Per questo motivo abbiamo condotto una ricerca per individuare il numero minimo di prelievi ematici (e i relativi tempi) necessari a determinare la AUC. I risultati, pubblicati sulla rivista Therapeutic Drug Monitorino (Gusella M, Terrazzi E, Ferrari M, Padrini R. New sampling strategy for determining 5-fluorouracil area under the concentration-time curve after rapid intravenous bolus. Ther Drug Monit 2002), indicano che sono sufficienti due determinazioni a 2.5 e 20 min dalla somministrazione e.v. del farmaco per una stima sufficientemente accurata e precisa dell'AUC.

Conclusioni

I risultati di questa ricerca (e quelli che si sono resi disponibili 2 anni dopo relativi al follow-up) permettono di migliorare la capacità di individuare a priori la dose ottimale di 5-fluorouracile per ogni paziente (mediante l'analisi bioimpedenzometrica) e di attuare degli aggiustamenti posologici a posteriori (monitoraggio dell'AUC) particolarmente utili nei pazienti che non presentino segni di tossicità in quanto ricevono dosi insufficienti di farmaco.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 937/06/99

Responsabile Scientifico Piva Ivana - Ente Proponente ULSS 6 di Vicenza

“Progetto di educazione alimentare nel paziente obeso”.

Nel mondo ci sono circa 300 milioni di adulti obesi e 900 milioni di individui sovrappeso.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito l'obesità un'epidemia globale e la considera un grave problema per la sanità pubblica. Inoltre l'obesità viene ora identificata come una malattia cronica gravata da diverse complicanze.

L'obesità è una condizione patologica tra le più diffuse nelle società industrializzate tanto da essere definita, negli Stati Uniti, il primo problema di salute. Visti i tassi di incidenza in rapida crescita, quella dell'obesità può essere considerata una vera e propria epidemia, che ora sta interessando anche paesi in rapida evoluzione tecnologica come il Kuwait o le isole del Pacifico della Nuova Caledonia.

In questi paesi i tassi di prevalenza del sovrappeso e dell'obesità combinati insieme, raggiungono anche il 70% tra la popolazione adulta.

In Italia l'obesità è ancora un problema aperto e di difficile soluzione.

Oltre 4 milioni sono le persone adulte obese in Italia. Il sovrappeso nella popolazione è in continua crescita e il trend italiano è sovrapponibile a quello degli altri paesi occidentali.

Nel 2000 il tasso di prevalenza dell'obesità e del sovrappeso era pari rispettivamente al 9% e al 33%, secondo i dati più recenti ISTAT negli ultimi cinque anni ha subito un aumento del 25%.

Questi dati sono in linea con quelli riportati da altri studi eseguiti a livello nazionale che riferiscono che la prevalenza dell'obesità in Europa varia dal 10 al 20% nei maschi e dal 10 al 25% nelle donne.

L'obesità costituisce un importante fattore di rischio per lo sviluppo di malattie anche gravi. I soggetti obesi sono molto esposti al rischio di diventare ipertesi, di essere soggetti allo stroke, alla sindrome delle apnee notturne e altri problemi respiratori.

In particolare l'adiposità viscerale è associata a un insieme di anomalie metaboliche ed emodinamiche conosciute come sindrome metabolica.

Il diabete mellito tipo 2 ne è l'espressione. Per queste malattie ad insorgenza multifattoriale, è difficile identificare un solo fattore responsabile; esse rappresentano infatti il risultato di una complessa serie di interazioni tra genetica, ambiente e stili di vita, al cui interno l'alimentazione ha un ruolo importante.

A causa del lungo periodo tra esposizione al rischio alimentare e comparsa della malattia, è talvolta difficile stabilire un collegamento tra fattori alimentari e condizione di salute. Tuttavia la comunità scientifica è concorde nell'attribuire alla dieta un ruolo significativo nella patogenesi delle malattie quali: cardiopatie ischemiche, malattie cerebrovascolari, diabete mellito non insulina dipendente, alcuni tumori, obesità, calcolosi renale e osteoporosi.

L'obesità è quindi un fattore di rischio e costituisce un problema crescente di salute pubblica. L'incremento dell'obesità e del peso medio della popolazione, non sembra essere dovuto ad una maggiore assunzione di calorie, il cui consumo al contrario è in declino, ma ad una maggiore sedentarietà o ad uno stile di vita che, per quanto attivo, non è sufficiente a bilanciare gli eccessi nutrizionali indirizzati verso una dieta comunque iperlipidica.

Per contro il rischio di complicanze dell'ipertensione, delle dislipidemie e del diabete aumenta in relazione all'incremento del BMI.

L'indice di massa corporea (BMI) è accettato come indicatore per la definizione del sovrappeso.

I valori normali di BMI sono compresi tra 18,5 e 24,9 kg/m²; sovrappeso 25-29,9 kg/m²; obesità >30 kg/m².

Il solo indice di massa corporea non è però sufficientemente predittivo dell'effetto nocivo dell'obesità ma è l'obesità viscerale (circonferenza vita >102 cm negli uomini, >88 cm nelle donne) che aumenta la mortalità, il rischio di comparsa del diabete, di eventi cardiaci e di alcune forme di cancro.

Questo dato è di estrema importanza considerando ciò che è emerso dalle ricerche di Bjorntorp: l'obesità viscerale, può essere determinata da situazioni prolungate di stress, essendo le reazioni endocrine da stress caratterizzate da un aumento dell'attività dell'asse ipotalamo ipofisi-surrene (HPA) e del sistema nervoso simpatico centrale.

E proprio prendendo in considerazione questi dati, il nostro lavoro ha voluto considerare e confrontare non solo il peso e l'indice di massa corporea, ma anche la circonferenza della vita. Ha voluto inoltre soffermarsi, nel lavoro di gruppo, sul problema dello stress, fornendo ai pazienti nozioni su cos'è lo stress, perché si manifesta e come fare a controllarlo e gestirlo con tecniche cognitive - comportamentali.

Alla luce dei dati emersi da numerosi studi e ricerche sul miglior approccio al paziente obeso, il mondo scientifico ha riconosciuto l'importanza di modelli riabilitativi multidisciplinari – integrati e di interventi terapeutici finalizzati alla promozione di un ruolo attivo del paziente nella gestione del processo di cura della malattia.

La terapia dell'obesità richiede percorsi diagnostici e terapeutici che tengano conto della complessità della patologia nei suoi aspetti eziopatogenetici, delle numerose complicanze associate e della rilevanza psico- sociale di questa patologia. L'intervento psicologico risulta un elemento importante nel trattamento clinico dell'obesità in quanto la cura del corpo e del proprio stile alimentare implica sempre un intervento sul comportamento, sui pensieri irrazionali e sullo stile di vita.

Inoltre, l'obesità è ampiamente riconosciuta come una malattia ad andamento cronico.

In considerazione di quanto fin qui detto, la nostra equipe ha deciso di stilare nel 1999 un progetto di educazione alimentare nel paziente obeso, della durata di 2 anni.

Si è voluto svolgere un lavoro che prendesse in considerazione le varie problematiche, non solo fisiche, ma anche psicologiche a cui il paziente obeso va incontro. L'intervento terapeutico ha inoltre cercato di rendere attivo il paziente nella gestione del processo di cura utilizzando anche il lavoro di gruppo per un rinforzo collettivo.

L'esperienza sull'educazione dei pazienti maturata nell'ambito di altre patologie croniche (diabete) suggerisce che i risultati più convincenti si ottengono con programmi integrati che uniscono l'educazione individuale con quella di gruppo.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il modello estetico di bellezza proposto dalle società occidentali sviluppate è diventato sempre più quello della magrezza. Ciò ha lentamente influenzato i gusti della popolazione e la magrezza è così diventata oltre che un simbolo di bellezza, anche un simbolo di autocontrollo e di successo. E' chiaro quindi che per una persona obesa il raggiungimento di un peso "ideale" non può essere un corretto obiettivo perseguibile perché porta spesso solo ad una perenne frustrazione. Inoltre cercare di raggiungerlo può portare, alcune persone predisposte, a sviluppare gravi disturbi del comportamento alimentare o dell'umore, quale ansia e depressione.

L'incidenza dei disturbi psichici (depressione) tra i pazienti obesi in trattamento è stimata intorno al 28%. Questo dato è di estrema importanza considerando come gli aspetti psicopatologici giochino un ruolo importante nel determinare l'atteggiamento dei soggetti obesi nei confronti del cibo e dell'alimentazione.

Noi crediamo che la possibilità di elaborare in gruppo questo gap tra quello che la persona "vorrebbe essere" e quello che può "realisticamente diventare" sia estremamente importante in un'ottica preventiva di eventuali disturbi psichici.

Questi dati ci portano a pensare come sicuramente i pazienti traggono beneficio da un trattamento a lungo termine, sia di gruppo che individuale, quest'ultimo è però molto più costoso e sembrerebbe avere una minor compliance.

Considerando i valori nella loro globalità, sembra che il lavoro di gruppo abbia dato un esito migliore nella diminuzione dei valori ematici analizzati e del peso corporeo.

Ciò che a noi è parso più importante come risultato del nostro lavoro è che, dai colloqui fatti con i soggetti testati, abbiamo riscontrato un miglioramento più rilevante della qualità di vita (QdV) tra le persone del gruppo sperimentale piuttosto che quello di controllo.

La QdV è un termine che è entrato ormai nel gergo comune; la sua diffusione è da mettere in rapporto all'allungamento della vita stessa e all'aumentata prevalenza di malattie croniche e degenerative.

Esso, tuttavia, è ancora difficilmente definibile, in quanto comprende la valutazione globale della soggettività degli individui nonché la considerazione di tutti quegli aspetti culturali, sociali ed antropologici che contribuiscono a determinare la percezione della realtà dell'individuo.

In un documento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, noto come documento di Copenhagen del 1984, è stato sancito che *“ the goals of health care are to add years to life and to add life to years ”*.

In questo concetto, vengono comprese le due dimensioni principali che costituiscono lo stato di salute di una popolazione: la morbilità e la mortalità. Viene, inoltre, implicitamente precisato che per un singolo paziente un beneficio ottenibile da un trattamento è rappresentato dall'aumento della sopravvivenza, dalla migliore qualità di vita, o da entrambe queste dimensioni.

Riflettendo sul nostro lavoro di gruppo con pazienti obesi, per qualità della vita noi intendiamo un allargamento dello "spazio di vita" del soggetto che determina un'aumentata attività lavorativa, sociale, relazionale, una maggior consapevolezza di sé e delle capacità decisionali, una minor dipendenza dagli altri, una miglior autostima e considerazione di sé, una migliore self-efficacy, un diminuito imbarazzo per il proprio peso con accettazione del proprio aspetto fisico.

E, non da ultimo, una più alta aspettativa di vita, considerando come l'aumento di peso e dell'assetto lipidico nel sangue, siano indice di maggior rischio cardiovascolare.

Questi dati li abbiamo rilevati durante gli incontri finali nel gruppo sperimentale e durante le ultime visite nel gruppo di controllo. E sono a conferma di come, oltre a migliorare la compliance terapeutica, la riabilitazione psicologica può agire sui diversi aspetti della personalità del paziente che sottendono al mantenimento o all'aggravarsi della condizione ponderale. Di qui la necessità di un approccio che superi la riduzione dell'obesità ai singoli elementi che la compongono e a spiegazioni di tipo meccanicistico lineare, per approdare a una epistemologia della complessità.

Nella diagnosi e nella cura dell'obesità occorre introdurre modalità di trattamento che svelino le dinamiche disfunzionali nel "sistema che autoperpetua la patologia", al fine di aiutare il paziente ad avere comportamenti maggiormente adeguati.

Appare, infatti, sempre più chiaro che molti sistemi di gestione dei trattamenti di vario costo possono produrre iniziali perdite di peso, mentre è stato rilevato che nessun metodo specifico di trattamento è risultato capace di sostenere queste perdite di peso per un periodo superiore a 1-2 anni dopo la fine del trattamento stesso. L'aumento del periodo di trattamento e dei programmi di mantenimento ritarda efficacemente la ricaduta. Noi crediamo fermamente, alla luce dell'esperienza fatta, che il percorso riabilitativo deve avere anche l'obiettivo di far uscire il paziente da modalità comportamentali rigide e ripetitive e da processi di pensiero che possono essere considerati l'origine e la causa del perpetuarsi dell'obesità. Ed inoltre, crediamo che sia estremamente importante seguire i pazienti per tempi lunghi, visto che oggi l'obesità viene considerata dal mondo scientifico una patologia cronica e invalidante.

La nostra esperienza ci insegna anche come il farmaco contro l'obesità rende molto di più, in termini di dimagrimento ponderale e mantenimento del peso perso, se dato a pazienti che hanno seguito una terapia di gruppo. Possiamo ipotizzare che questa miglior efficacia del farmaco sia dovuta al fatto che, pazienti seguiti a livello psicologico, hanno raggiunto una migliore qualità di vita e si sentono meglio sia a livello psicologico che fisico. Ciò contribuisce a mantenere una buona compliance per il proseguimento del calo ponderale anche se il soggetto non fa più terapia di gruppo.

Anche gli ultimi lavori sull'obesità in ambito internazionale confermano come un miglioramento della qualità di vita incida sul calo ponderale e sul BMI e riduca i rischi cardiovascolari.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 938/02/99

Responsabile Scientifico Polico Cesare - Ente Proponente ULSS 18 di Rovigo

“Radio chemioterapia neoadiuvante, ad intensificazione di dose radiante, nelle neoplasie rettali localmente avanzate: parametri predittivi della risposta, downstaging, chirurgia conservativa, complicità, qualità di vita”.

AREA DI INVESTIGAZIONE

Premessa

Esiste un rapporto diretto tra dose radioterapica e frequenza di risposte patologiche complete.

Il raggiungimento di una risposta patologica completa:

- rende più probabile la chirurgia conservativa
- consente un controllo locale pressoché del 100%
- è un forte fattore prognostico per la sopravvivenza

Ad una intensificazione del carico terapeutico neoadiuvante sembra corrispondere un incremento della tossicità, sia acuta che cronica.

Ipotesi di partenza

La realizzazione di uno schema radio-chemioterapico neoadiuvante ad intensificazione di dose potrebbe ottenere un miglior tasso di remissioni patologiche di malattia, al fronte di un incremento di tossicità attesa: sia acuta, sia preoperatoria, sia tardiva.

RISULTATI

RISPOSTA LOCALE

La valutazione della risposta locale al trattamento pre-operatorio può essere solo quantitativa: citoriduzione della massa neoplastica (Downsizing) o qualitativa, comportando una regressione di quei parametri che determinano la classificazione secondo i criteri del Sistema TNM: retrostadiazione (Downstaging). Si ricorda come dopo trattamento pre-operatorio esiste lo Stadio O, che viene così definito quando nel pezzo operatorio non viene più riscontrata neoplasia, né a livello della neoplasia primitiva né a livello linfonodale o quando vengono riscontrati solo microfocolai di malattia residua a livello della neoplasia primitiva, in assenza di malattia linfonodale. Tale situazione viene identificata anche come risposta patologica maggiore o come risposta patologica > 95%. Le due condizioni (pT0, N0 e pTmic.N0) vengono equiparate perché di fatto prognosticamente molto simili. Tali eventi sembrano infatti avere un basso rischio sia di recidiva locale che di diffusione a distanza della malattia.

Downsizing

La riduzione del diametro massimo della neoplasia, misurato alla diagnosi, con l'ecografia endorettale o con la RM e sul pezzo operatorio è notevole; si passa da una misura mediana di 5 cm pre-trattamento a quella di 0,5 cm patologica. La mediana della percentuale di riduzione è del 95%, valore utilizzato ad indicare il residuo solo microscopico di malattia. In oltre il 90% dei casi la neoplasia si è ridotta di oltre il 50%. Un solo caso è rimasto invariato, in nessun caso si è registrata progressione volumetrica della neoplasia primitiva.

In Letteratura oggi si discute se, dopo trattamento combinato radio-chemio pre-operatorio, siano sufficienti 5 mm o 10 mm per considerare l'atto chirurgico oncologicamente radicale. Alcuni studi sembrano suggerire che anche il riscontro di infiltrazione del margine di sezione chirurgica, dopo radio-chemio non sia un fattore prognostico negativo per la ricaduta locale di malattia.

In considerazione di quanto sopra si intuisce l'importanza che potrebbe avere, in alcuni casi borderline per una chirurgia demolitiva, la riduzione di massa neoplastica secondaria al trattamento pre-operatorio.

Downstaging

Esaminiamo separatamente i due parametri "T" ed "N":

Parametro "T"

- In un solo caso (2%) il riscontro patologico ha evidenziato un pT4, lesione più avanzata di quella ipotizzata alla stadiazione.
- Esiste uno "zoccolo duro" del 21% nel quale non si ottiene retrostadiazione del "T".
- Del rimanente 77% (casi retrostadiati) il 20% passa a pT2, il 3% a pT1, il 28% presenta completa scomparsa patologica della neoplasia (pT0) ed nel 26% si riscontrano solo residui microscopici di malattia (pTmic).

Parametro "N"

- I casi che alla stadiazione presentavano segni di interessamento neoplastico linfonodale erano il 48% della casistica; nel riscontro patologico solo il 22%

DOWNSTAGING GLOBALE

- La distribuzione per stadio patologico è assai diversa da quello clinico-strumentale alla diagnosi, che identificava il 48% dei casi in stadio III ed il 52% in stadio II. Alla valutazione patologica le frequenze sono: 22% stadio III, 10% stadio II, 19% stadio I e 50% stadio 0, di cui il 19% pT0, ed il 21% pTmic.
- Il tasso di downstaging, valutato dal confronto tra lo stadio clinico e quello patologico, è risultato essere del 73%. La variazione assoluta di stadio tra quello clinico-strumentale e quello patologico ha evidenziato: nel 10% una progressione di stadio, nel 17% una stazionarietà, nel 14% una riduzione di un livello, nel 38% una riduzione di due livelli e nel 21% la riduzione di tre livelli (dallo stadio III allo stadio 0).
- Se esaminiamo la distribuzione per stadio per i soli casi che hanno ottenuto un downstaging (73% del totale), si evidenzia che nel sottogruppo dei "responder" la retrostadiazione è stata veramente importante: il 93% dei casi era in stadio 0-I; il 67% nel solo stadio 0.

CHIRURGIA

Dopo il trattamento neoadiuvante, alla fine della IV settimana, il paziente veniva rivalutato per definirne la risposta clinico- strumentale e qualora la lesione iniziale si fosse ridotta di oltre il 50% l'intervento chirurgico veniva programmato in VI-VIII settimana, mentre nei tempi più brevi possibili se la risposta era inadeguata.

La scelta del tipo di chirurgia era tendenzialmente legata al livello ed all'estensione della neoplasia riscontrata all'atto chirurgico, non basandosi necessariamente su quanto evidenziato dalle indagini strumentali prima del trattamento neoadiuvante. Nei 63 pazienti sottoposti a chirurgia l'intervallo medio tra la fine delle terapie neoadiuvanti e l'intervento è stato di 9 settimane.

L'atto chirurgico è stato di conservazione dello sfintere nel 73% dei casi. Questo dato, in una casistica ove la distanza mediana tra il polo inferiore della neoplasia e la rima anale è di soli 4 cm, si è sicuramente giovato della citoriduzione neoplastica secondaria al trattamento pre-operatorio.

Se indaghiamo sul tipo di chirurgia praticata, rispetto alla distanza della neoplasia dalla rima anale, riscontriamo come tutte le neoplasie distanti più di 5 cm siano state trattate con chirurgia conservativa, al fronte di un 62% per le neoplasie più distali. Limitandoci all'esame delle sole neoplasie distali (meno di 5 cm dalla rima anale), vediamo come l'esperienza del chirurgo influenzi la tecnica scelta: un chirurgo "dedicato" riesce a praticare un atto conservativo nel 89% dei casi, al fronte di un 46% del chirurgo "generale".

La tipologia degli atti chirurgici praticata dalle varie equipe che hanno contribuito alla realizzazione dello studio è attuale o risente della "perifericità" di buona parte delle Divisioni.

Abbiamo potuto realizzare un confronto con i dati chirurgici di un prestigioso centro Nord Americano: MD Anderson Cancer Center di Houston, che ha pubblicato i dati in dettaglio. Per situazioni analoghe: neoplasie distali (< 6 cm dalla r.a.), l'incidenza di chirurgia conservativa era per le neoplasie retrostadiate: 53% (Houston) vs 64% (Gruppo Rovigo); mentre per quelle invariate: 38% (Houston) vs 58% (Gruppo Rovigo). Da questo confronto la possibilità che un paziente, che si rivolga ad un dei Centri che formano il nostro team, al termine dell'intero iter, possa subire un atto chirurgico "radicale" conservativo è più elevata di quella di un analogo paziente americano, che si rivolga al MD Anderson di Houston.

L'entità della risposta al trattamento pre-operatorio ha influenzato la scelta della tecnica chirurgica? Dai dati in nostro possesso la risposta è no: l'incidenza di chirurgia conservativa nei pazienti in risposta pressoché completa vs tutti gli altri non differisce significativamente (77% vs 69%)

Analogamente né l'età, né il sesso sono fattori che abbiano rilevanza nella frequenza della chirurgia conservativa.

TOSSICITÀ

Trattamento neoadiuvante

La tossicità enterica di grado 2 (EORTC score) si è manifestata nel 14% mentre quella di grado 3 nel 3%. Tali basse frequenze sono da imputare da una parte alla ottima tolleranza del 5-FU quando somministrato in PVI e dall'altra alla ridotta quota di intestino tenue compreso entro il volume irradiato alla dose di 47 Gy (18 cc di media, nel 82% completamente escluso) e sempre completamente escluso dal volume che hanno ricevuto dosi maggiori.

La tossicità ematologica di grado 2 (EORTC score) è stata riscontrata nel 6% e quella di grado 3 nel 3%; anche in questo caso la via di somministrazione del 5-FU fa la differenza rispetto ad altre schedule, sicuramente più tossiche.

La proctite è stata la tossicità caratterizzante questo approccio terapeutico preoperatorio. Si è manifestata nel 19% dei casi in grado 2 e nel 11% in grado 3. Questo evento trova logica spiegazione in quanto l'erogazione dei 54 Gy coinvolge tutta la neoplasia con almeno 2 cm di margine in ogni direzione, con estensione cranio-caudale nella media di circa 10 cm, cioè di pressoché tutto il retto. A questi valori di dose la tossicità acuta è sicuramente più elevata, ma generalmente il ripristino alla norma avviene entro 7-15 gg dalla fine del trattamento. Un solo paziente non ha completato la radio-chemioterapia pre-operatoria per comparsa di tossicità G3 enterica e proctitica, che ha richiesto ospedalizzazione. Un solo paziente, pur continuando regolarmente il programma radioterapico ha interrotto al 22° giorno la somministrazione del 5-FU per tossicità ematologica.

Chirurgia

- Complicanze peri-operatorie maggiori: sono stati registrate nel 13% dei casi: 2 stenosi anastomotiche, 3 fistole retto-vaginali, 2 emorragie, 1 deiscenza dell'anastomosi; tutte le complicanze si sono risolte.
- Complicanze peri-operatorie minori: registrate nel 10% dei casi: 1 ascesso pelvico, 1 ascesso perineale, 1 substenosi anastomotica, 3 infezioni della ferita.

Dal confronto con la Letteratura, che riporta incidenze di complicazioni maggiori in un range tra il 33% ed il 7% con valori medi che si assestano tra il 10% ed il 15%, si evince che il tasso di complicanze riscontrate nel nostro studio è sovrapponibile a quello di analoghi studi, ove sia stata utilizzata radio-chemioterapia pre-operatoria, non intensificata.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 939/02/99

Responsabile Scientifico Polico Rolando - Ente Proponente ULSS 12 Veneziana

“La tecnica policentrica ad archi multipli (PAM) nella cura dei gliomi cerebrali”.

Premessa

La relazione finale, per chi volesse approfondire la seguente sintesi che commenta gli allegati della relazione stessa, è agli atti della Segreteria Regionale Sanità e Sociale e si articola sui seguenti allegati:

- Allegato I: relazione clinico-radiologica di ciascun caso trattato con la tecnica PAM e discussione delle curve di sopravvivenza
- Allegato II: risultati della ricerca di base
- Allegato III: relazione finanziaria della spesa
- Allegato IV: suggerimenti di ordine socio-sanitario indotti dalla Ricerca.

Sintesi

Presentazione dell'allegato I:

Descrive i 93 casi di neoplasia cerebrale radio-trattati presso la Unità Operativa Radioterapia di Mestre nel periodo oggetto della Ricerca Sanitaria Finalizzata Regionale.

Si tratta per lo più di gliomi cerebrali ad alto e a basso grado di malignità, pur non essendo stati esclusi dalla descrizione alcuni casi con Istologia diversa (meningiomi, metastasi), particolari per la sede di insorgenza o per altre caratteristiche, comunque esemplificativi delle possibilità terapeutiche peculiari della tecnica PAM.

Nei primi dodici casi la documentazione iconografica radiologica del tumore, il piano di cura e la ricostruzione tridimensionale della distribuzione di dose, attestante la stretta conformazione della dose al volume del target, sono preceduti da una breve relazione clinica, per rendere manifesta la metodologia impiegata nello studio dei casi, nella scelta della tecnica di radioterapia e della dose impiegata. I casi successivi (81) sono descritti attraverso la raccolta del materiale iconografico radiologico, del piano di cura e della ricostruzione tridimensionale della distribuzione di dose.

Commento all'Allegato I:

Presentando tutti i casi di neoplasia cerebrale osservati nel periodo oggetto della RSF (e trattati tutti con la tecnica PAM), si dimostra la applicabilità estensiva di questa procedura alla cura dei tumori cerebrali raggiungendo lo scopo principale di questa RSF.

La tecnica policentrica ad archi multipli consente una distribuzione di dose strettamente conformata al volume del bersaglio, qualunque sia la dimensione e la forma geometrica del tumore, rappresentando così una estensione innovativa e per molti aspetti integrativa di altre tecniche di irradiazione in regime ipofrazionato accelerato, quali la radioterapia /radiochirurgia stereotassica statica o dinamica, praticate sia con gamma unit, sia con acceleratori lineari, sia con acceleratori robotizzati (Cyberknife).

Qualunque lettore competente, che scorrerà le immagini raccolte, potrà osservare che alcuni dei casi presentati avrebbero potuto essere trattati con le altre tecniche di radioterapia citate, ma che la maggior parte di essi (che costituisce la quotidianità professionale), non sarebbe stata candidabile a quelle procedure radianti.

Presentazione esemplificativa della Casistica. Cito a titolo d'esempio il caso 1, trattato postoperatoriamente per glioblastoma, R1 istologico (biopsie ai margini di resezione positive) nel 2000 e attualmente (2004) vivente ed in piena attività professionale, o il caso 5, astrocitoma diffuso, G2, R2 post-operatorio, radiotrattato con successo nel 2000 su un volume non affrontabile con procedure radiochirurgiche, o il caso 6, plurioperata e recidivata ad una radioterapia praticata in Francia. La paziente ci è stata inviata da altra Radioterapia, che usualmente pratica trattamenti radiochirurgici, proprio per una Rt strettamente conformata sulla sede neoplastica (letto operatorio) e la tecnica PAM ha consentito il trattamento senza danno neurologico della paziente (II trattamento) e con efficacia terapeutica (non recidiva al follow-up), su un volume comunque non affrontabile con altre tecniche radiochirurgiche

Il lettore potrà osservare dei casi forse trattabili con altre metodiche radiochirurgiche (o forse no), come dei casi di tumori a bassa malignità (meningiomi), o maligni (metastasi), di sedi particolarmente critiche (seno cavernoso ad esempio) o di volumi troppo grandi o borderline per tecniche diverse dalla PAM. Noterà che comunque l'effetto terapeutico è stato quello delle migliori cure in tali distretti e che quindi la Tecnica PAM consente risultati almeno analoghi a quelli delle tecniche considerate più evolute. Lo dimostrano il caso 2 (meningioma del seno cavernoso) anch'esso trattato nel 2000, vivente con regressione radiologica di malattia e senza gli esiti probabili di un accesso chirurgico al tumore, o il caso 8, meningioma anch'esso della base, recidivato alla chirurgia e risolto, pur di discrete dimensioni, dal trattamento con la tecnica PAM. Analogo il caso 10. Remissione completa radiologica ottenuta nel caso 13 (id 17496), metastasi del seno cavernoso di un tumore della parotide propostoci da altra

Radioterapia del Veneto dopo consulenza all'IEO di Milano (esclusa in tale sede la possibilità di un trattamento radiochirurgico. Il lettore potrà osservare qualche caso di metastasi, normalmente affrontato con stereotassia statica o dinamica. Ma se le dimensioni sono cospicue, come nel caso 11? La tecnica PAM dimostra di poter affrontare il problema con efficacia, alternativamente alla rinuncia terapeutica costituita dalla radioterapia convenzionale.

I casi raccolti dimostrano come siano trattabili neoplasie di distretti delicati, come il caso 15 (id 17634) od il caso 17 (id 18430 (neoplasia pontina nodulare, biopsiata a Friburgo, G3 od il caso 18 (id 18215), di neoplasia diffusa-infiltrante del ponte.

Una breve considerazione sul caso 19 (id 18413); si tratta di un giovane italiano di 18 anni sottoposto a biopsia stereotassica a Friburgo e da quella neurochirurgia inviatici per la Radioterapia, con diagnosi di astrocitoma G2 del ponte ed esteso al midollo allungato ed al midollo cervicale. Trattandosi di strutture a radioresistenza diversa e valutando le diverse dimensioni espresse dalla neoplasia nei distretti anatomici citati, si decide di impiegare la PAM in senso tomoradioterapico attraverso i criteri delle tecniche impieganti emicampi schermati. Non rischiando in tal senso sovraesposizione pericolosissime sulla linea di congiunzione, la componente sovramidollare è stata trattata con tre emicampi in terapia cinetica di 180 gradi, per una dose di 5 Gy/giorno per 5 giorni, calcolati all'isodose di riferimento e sensibilmente crescente all'interno della massa. Simultaneamente la componente midollare della neoplasia è stata trattata con un unico campo cinetico di 180 gradi, con margini circoscritti alla descrizione del tumore. Opportunamente pesato in relazione ai tre campi del volume superiore, esso ha consentito di irradiare il volume midollare con una dose di 4 Gy/die per 5 giorni, omogeneamente distribuita. Il paziente ha avuto una rapida remissione sintomatica, seguita da un miglioramento radiologico e risulta attualmente vivente, studente universitario nella sua città di origine, in Emilia Romagna. Analogo difficile trattamento sul paziente 49 (id 18546), anch'egli italiano biopsiata a Friburgo ed inviatici per tale trattamento

I casi 22 (id 18062) e 23 (id Theraplan 01010) realizzano esempi di impiego simile della tecnica PAM in situazioni diverse e più facili, mentre il caso 49 (id 17453), ritrattamento in plurioperata e pluriirradiata in Italia ed in Germania, costituisce un esempio particolarmente complesso dell'impiego della tecnica PAM in senso tomoradioterapico.

L'esempio 20 (id 14322) è relativo ad un caso di enorme oligodendroglioma frontale sn, resosi evidente, tra l'altro, per la comparsa di afasia motoria. Tale paziente è portato ad esempio di un certo numero di ritrattamenti praticati (3 in questo caso), che non hanno avuto per effetto, dato il confinamento del volume di trattamento, degli effetti neurolesivi importanti. Questo a significare che ogni caso può essere rivalutato, se necessario, per ritrattamento.

Il caso 26 (id 15909 per esempio, uno spongioblastoma recidivato a plurimi interventi, all'infissione di un seme di iodio, ad un trattamento di tutto l'asse cerebrospinale (trattamenti eseguiti in altra sede, è stato sottoposto successivamente, a quattro trattamenti ulteriori con la tecnica PAM, due che sottintendevano la stessa sede e due sedi di recidiva diverse. La paziente ha presentato un importante beneficio soggettivo ai trattamenti ed è vissuta circa 2 anni, con una qualità di vita da lei e dai familiari definita soddisfacente

Il caso 61 (id 14640) evidenzia come sia possibile il trattamento di piccole localizzazioni secondarie di sedi critiche con la tecnica PAM in regime ipofrazionato accelerato in totale sicurezza di efficacia (verificata in questo come in altri casi analoghi), in pressoché assenza di rischio di danno iatrogeno grave.

I casi infine 64 (id 18622), 66 (id 18634), 71 (id 17459), 75 (id 18050), 77 (id 16570), 78 (id 17377), 89 (id 17890), 91 (id 18618) e 92 (id. 15617) dimostrano l'applicabilità di procedure di radioterapia ipofrazionata accelerata a tumori cerebrali di grandi dimensioni ed irregolari nella loro geometria, impossibile con qualsiasi altra tecnica oggi disponibile. Anche le tecniche ad intensità modulata del fascio radiante a campi statici multipli non consente, a parità di conformazionalità, di ottenere forti gradienti interni al tumore, caratteristici della tecnica PAM. Probabilmente le tecniche di modulazione dinamica del fascio radiante in narcoterapia (MAX), con opportuno sistema di calcolo "inverse planning" e linac robotizzati (Cyberknife) potrebbero costituire il reale "nuovo" prossimo futuro della radioterapia, qualora tali apparecchiature (2 in Italia) venissero impiegate anche con queste finalità e da persone di provata esperienza in tali trattamenti.

Le curve di sopravvivenza che si presentano sono relative all'esperienza di Mestre: rappresentano un "report professionale" dei casi trattati dal 1994 e non i risultati di uno studio, con il significato che ha un report che non ha criteri di esclusione dal trattamento ma che non ha elementi comparativi di due gruppi di pazienti diversamente trattati. Si osservi comunque per i giorni ad alto grado di malignità un trend migliore dei casi trattati con la tecnica PAM rispetto ai casi trattati negli anni precedenti con radioterapia convenzionale con dosi e frazionamenti internazionalmente accettati. I casi trattati per giorni a basso grado di malignità, pur con le analoghe riserve legate ad un report e non a uno studio (non è possibile per la numerosità limitata dei casi alcuna stratificazione per fattori di rischio) mostrano tuttavia un andamento molto buono, sicuramente incoraggiante per un eventuale "studio di fase 3", con una caduta della sopravvivenza nel primo periodo di osservazione, che potrebbe essere indicativo del

previsto inquinamento di forme miste G2 vs G superiore, con una curva che tuttavia successivamente si appiattisce, che potrebbe essere indicativo finalmente di efficacia terapeutica della radioterapia.

Presentazione dell'allegato II:

Contiene in 10 fogli lo stato di avanzamento del lavoro svolto dalla Fisica Sanitaria e dalla Consulente esterna proposta per la prosecuzione della ricerca di base sui campi piccoli e minimi, assolutamente necessaria e punto irrinunciabile di questa ricerca, dato che solo il sempre più preciso e verificato controllo tra le dose richieste e le dose somministrate costituisce principale interesse per l'intendimento curativo e di sicurezza nel contempo. Tutto il lavoro richiesto dalla Direzione della Fisica Sanitaria attraverso questa Direzione Scientifica al Consulente esterno dott. Gallo è stato svolto e gli obiettivi prefissati sono stati raggiunti, essendo quindi risultato pienamente soddisfacente e proficuo il rapporto collaborativi tra il consulente esterno e il personale della Fisica Sanitaria.

Indicazioni socio sanitarie

La RSF n.939/02/99 fa seguito alla RSF n.531-01-94. Nel '94 abbiamo dimostrato la estensiva applicabilità della tecnica policentrica ad archi multipli nella cura dei tumori polmonari e, attraverso il trattamento di casi limitati di neoplasia cerebrale, ORL e di altri distretti, la possibile estensione delle sue indicazioni a tutti i tumori di questi distretti corporei. Quella ricerca (ed osservazioni precedenti e successive) ha sicuramente dimostrato una notevole efficacia ed una notevole efficienza di questa tecnica nella radioterapia dei tumori di quei distretti. Questa ricerca dimostra la possibilità di trattare anche tutti i casi di tumore cerebrale, non solo quelli per i quali è indicato un trattamento radiochirurgico (percentualmente pochi), in regime ipo-frazionato accelerato, ancora per un incremento in efficienza delle U.O Radioterapia (cicli brevi=molti pazienti trattabili, = ammortamento rapido delle risorse strumentali, = utilizzo migliore delle risorse umane, =mantenimento più facile di uno standard tecnologico d'avanguardia attraverso la non acquisizione patrimoniale delle risorse strumentali, = migliore compliance del paziente al trattamento, = minori spese per la famiglia, minori spese sociali (tempo di degenza...) e probabilmente di efficacia (punto da confermare quest'ultimo attraverso gli studi ad hoc, resi impossibili in quest'occasione per la scarsità del finanziamento concesso dalla Regione Veneto a questo progetto).

Si presentano (Allegato IV) successivamente una serie di immagini conclusive,

- che riassumono le caratteristiche della tecnica PAM
- che dimostrano attraverso molteplici casi clinici la sua applicabilità e la sua efficacia,
- che dimostrano i risultati (reports di lavoro) raggiunti in neoplasie scarsamente curabili con radioterapia tradizionale (tra i reports ricordo il 45% di remissioni patologiche osservate in pazienti con neoplasia polmonare in stadio IIIA-B inizialmente non operabili con un 20% di RI (residuo microscopico, spesso in un contesto tissutale regressivo), espressione quindi di un ancora non corretto timing tra RT e chirurgia.
- che dimostrano l'evoluzione concettuale di questa tecnica verso una procedura di radioterapia monoisocentrica, impiegante campi ad intensità modulata dinamica in arcoterapia (IMAT), guidata (prossimo impegno) da programmi di calcolo tipo inverse planning, con dosi simultaneamente diversificate sulle scorta di segmentazioni biologiche del tumore orientate da analisi dei volumi e delle caratteristiche biologiche spettroscopiche multivoxel della risonanza ovvero di biomarcatori diversi dal FDG in PET (biomarcatori dell'ipossia, della neoangiogenesi, della differenziazione e cinetica cellulare...).

Le implicazioni sociosanitarie derivanti dall'impiego estensivo di tecniche di ipofrazionamento accelerato sono intuitive; le riassumo nei concetti già espressi:

- maggiore efficienza della radioterapia
- minori liste d'attesa
- migliore utilizzo delle risorse strumentali ed umane
- maggiore efficacia delle cure
- migliore compliance alle cure da parte dell'utenza
- abbattimento della mobilità passiva all'estero e verso altre regioni
- incremento sensibile dell'attrazione da altre regioni

Che cosa è necessario?

Ad avviso di questo Direttore Scientifico servono:

- una radioterapia in Regione Veneto adeguatamente strutturata e fortemente orientata in senso radioterapico-radiochirurgico, con intendimento sia assistenziale che educativo
- la persona adatta a dirigerla e le persone adatte a farla funzionare.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 941/06/99

Responsabile Scientifico Rosada Mara - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Proposta di organizzazione del Pronto Soccorso per la gestione dei pazienti che vi accedono per malattie dell'apparato locomotore e studio della prevalenza delle stesse nell'area padovana”.

Come prima tappa e come da proposta iniziale presentata alla Regione per questa Ricerca, è stata effettuata un'indagine epidemiologica intesa a stimare la prevalenza delle Malattie dell'Apparato Locomotore (MAL) nella nostra area, mediante un'intervista di un campione cosiddetto “ragionato” che risultasse rappresentativo della popolazione di Padova e provincia.

L'intervista si è basata su un questionario somministrato a 2450 persone recatesi presso il Dipartimento di Emergenza ed Accettazione (DEA) di questa Azienda Ospedaliera (Dipartimento Interaziendale di Pronto Soccorso e di Medicina d'Urgenza). La modalità del campionamento, molto importante in questo studio, è dettagliatamente spiegata nel capitolo “Metodi” della relazione presentata (allegato A: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

A nostro avviso questo studio appare interessante per 2 ordini di motivi:

- primo perché fornisce dati epidemiologici che erano assolutamente carenti nella nostra Regione, se escludiamo i risultati ISTAT del periodo 1999-2000, peraltro difficilmente comparabili a quelli della nostra indagine, poiché forniscono informazioni solo sulle malattie più frequenti e/o note della popolazione (artrite/artrosi, lombosciatalgia ed osteoporosi) e non indagano invece alcune MAL che nella nostra intervista sono risultate comunque frequenti (periartrite di spalla, sindrome del tunnel carpale, ernia del disco) e quindi incidenti in modo significativo sulla prevalenza totale.
- secondo perché rileva una elevata prevalenza delle MAL, sicuramente più di quanto atteso, ed indirettamente stima le percentuali di disabilità e di morbilità correlata a queste patologie, segnalando le MAL più frequenti in termini assoluti, quelle più spesso correlate a disabilità e morbilità e quindi maggiormente incidenti sui costi sanitari e sociali. Ancora fornisce dati relativi al ricorso a medici di base e/o specialisti, all'uso di farmaci e/o di cure fisiokinesiterapiche e alla percentuale di beneficio ottenuto dai suddetti trattamenti.

Ne emerge una assoluta necessità di migliorare l'approccio diagnostico e terapeutico per queste patologie, obiettivo da attuare in diversi settori e modi, soprattutto con una capillare informazione del cittadino e dei medici di base, con l'incremento dei servizi territoriali specialistici soprattutto quello reumatologico, ma anche con l'attuazione di alcune modifiche procedurali presso le Strutture di Emergenza, quale la nostra, dal momento che sono numerose le persone che vi affluiscono per malattie dell'apparato locomotore, anche se sicuramente rappresentano una minoranza rispetto all'incidenza totale nella popolazione.

Come passo successivo di questa ricerca, infatti, sono stati affrontati in modo più specifico alcuni modelli organizzativi per la gestione delle MAL presso un DEA. Innanzitutto, dalla disamina della letteratura sono emersi due modelli operativi proposti dall'American College of Rheumatology (ACR) nel '96 per la valutazione iniziale dei pazienti con sintomi muscolo-scheletrici acuti rispettivamente con impegno mono e poliarticolare (allegati B e C: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). Mediante un nostro studio è stato possibile confermare l'efficacia del primo modello proposto dall'ACR, ossia quello relativo ai casi con versamento monoarticolare acuto, dove l'artrocentesi e l'analisi del liquido sinoviale (LS) rappresentano i punti nodali dell'iter operativo. Lo studio era rivolto ai casi di monoartrite reclutati nell'ambulatorio ortopedico del DEA e sottoposti ad artrocentesi e quindi all'analisi del LS, effettuato presso il “Laboratorio Liquido Sinoviale” – Divisione di Reumatologia. I risultati hanno largamente confermato la rilevanza di tale procedura, peraltro di basso costo e di rapida e facile esecuzione: infatti in una elevata percentuale di casi sottoposti ad analisi del LS la diagnosi non era nota (83,6%), e si sono forniti precisi elementi diagnostici in 1/3 dei casi (gota, condrocalcosi) ed orientativi nei restanti 2/3, con una esatta discriminazione fra liquido infiammatorio e non (studio riportato in allegato D: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Viceversa, il secondo modello operativo proposto dall'ACR sull'impegno articolare multisistemico ci è apparso poco specifico e quindi, sull'esperienza maturata nella gestione in emergenza di queste patologie, abbiamo proposto un modello più semplice e soprattutto più specifico nell'affrontare MAL con impegno sistemico e/o poliarticolare. Queste linee guida, a nostro avviso sostitutive del modello americano, hanno lo scopo primario di individuare le forme che necessitano di ricovero e quelle che viceversa, con appropriati esami da effettuare a domicilio, possono essere rivalutate in ambienti specialistici. La flow-chart relativa è riportata in allegato E (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Come ulteriore ed ultimo obiettivo della nostra ricerca, è stata effettuata un'indagine sulla lombalgia, "low-back-pain" degli autori anglosassoni, sicuramente la MAL di più frequente riscontro presso i DEA, come risulta da un nostro studio presentato nel 2001 al 38° Congresso Nazionale della Società Italiana di Reumatologia (allegato F: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Quest'ultima ricerca aveva lo scopo di proporre uno schema farmacologico associato ad uno kinesiterapico ai soggetti che si presentavano al nostro DEA per lombalgia non grave, ossia verosimilmente sostenuta da sforzi muscolari, atteggiamenti posturali, con contratture, comunque di natura meccanica o infiammatoria delle strutture vertebrali e/o paravertebrali. Venivano esclusi dal reclutamento i soggetti con lombalgia da probabile o certa causa viscerale. Lo schema terapeutico proposto in questo studio è apparso sufficientemente efficace nelle forme non gravi, rispetto a quelle più gravi sostenute da vere e proprie patologie discali (ernia del disco, stenosi del canale vertebrale, spondilolistesi, osteoartrosi grave). Come diretta conseguenza è possibile sostenere che una terapia farmacologica non aggressiva e soprattutto una adeguata informazione dell'utente a praticare esercizi di rinforzo muscolare e posturali possono dare un adeguato beneficio in quelle persone che hanno episodi di LBP soprattutto di natura meccanica posturale e/o da sforzo, i quali rappresentano la maggioranza di coloro che accedono ad un DEA per "mal di schiena". In conclusione, questa ricerca nel suo complesso fornisce alcuni dati epidemiologici sulle MAL nella nostra area geografica, dato assolutamente carente in precedenza. Nell'ambito di specifiche patologie muscolo-scheletriche per le quali più frequentemente si accede a Strutture di Emergenza ed Accettazione, proponiamo tre modelli operativi:

- l'analisi del LS come esame cardine in tutti i casi di versamento monoarticolare
- uno schema farmacologico e kinesiterapico nelle forme non severe di LBP
- linee guida per l'approccio ai malati con disordini articolari e sintomi sistemici

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 942/06/99

Responsabile Scientifico Sabbadin Silvano - Ente Proponente Azienda ULSS 8 di Asolo

"Processi di provata efficacia e relativi indicatori per il buon funzionamento dei servizi infermieristici".

L'elaborazione dei questionari dell'indagine di clima sul Servizio Infermieristico ha permesso di valutare il grado di conoscenza e le aspettative che il personale dipendente delle varie Aziende ha nei confronti del Servizio stesso. A soli 7 anni dalla sua istituzione normativa infatti, il Servizio Infermieristico è divenuto una realtà consolidata all'interno delle aziende, i professionisti intervistati ne riconoscono ruolo e funzioni. Oltre alle Aree organizzative appare particolarmente riconosciuta e apprezzata l'Area Formazione che, nell'esplicitazione delle attese, risulta confermata quale ambito prioritario di sviluppo della risorsa umana. Il clima organizzativo percepito è sostanzialmente buono, si riconosce una valutazione estremamente positiva rispetto ai rapporti tra i professionisti e il Servizio Infermieristico. Ne è conferma che al medesimo il personale tende a rivolgersi non solo per problematiche di carattere tecnico organizzativo ma anche per la risoluzione di problematiche di ordine relazionale/ conflittuale.

Interessante appare il dato in merito alle ricadute che il Servizio Infermieristico ha avuto nello sviluppo assistenziale ed organizzativo nonché di valorizzazione del ruolo, infatti dall'analisi si è visto che i dati maggiormente positivi sono direttamente proporzionali con la data di istituzione dei Servizi Infermieristici e della loro continuità operativa. Ed è spesso tale variabile a spiegare gli elementi di disomogeneità tra i Servizi oggetto di indagine. Ne è conferma che in molti dei quesiti che andavano a indagare sia gli aspetti conoscitivi che gli elementi di percezione del clima relazionale, le risposte risultano significativamente positive nei casi in cui la relazione tra personale e Servizio Infermieristico ha carattere di stabilità e continuità nel tempo.

Infine i questionari hanno permesso di far emergere delle indicazioni importanti rispetto alle attese che i professionisti hanno nei confronti dell'attività del Servizio Infermieristico elementi centrali appaiono la formazione come già detto e il coinvolgimento nei vari aspetti organizzativi e tecnico professionali. Esigenze che risultano essere importanti e determinanti nella prospettiva di uno scenario organizzativo in continuo cambiamento.

Per ulteriori approfondimenti si precisa che presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale è presente un rapporto sulla ricerca suddiviso nei seguenti paragrafi ed allegati: 1. Introduzione, 2. Analisi generale dei Servizi Infermieristici, 2.1 Anno e modalità di costituzione, 2.2 Mission e Vision del Servizio Infermieristico, 2.3 Presenza del Budget di Servizio Infermieristico, 2.4 Numero e tipologia di operatori, 2.5 Analisi della micro-macro struttura organizzativa, 3. Tabella di comparazione delle funzioni dei Servizi analizzati, 4. Analisi delle funzioni, 4.1 Programmazione e Controllo, 4.2 Gestione del personale, 4.3 Organizzazione e qualità dei processi, 5. Indicatori organizzativo/gestionali di buon funzionamento dei Servizi Infermieristici, 6. Nuovi indicatori organizzativo/gestionali di buon funzionamento dei Servizi Infermieristici H, 7. Analisi di clima organizzativo. Allegato 1 (delibere aziendali di istituzione Servizi Infermieristici), Allegato 2 (questionario analisi Servizi

Infermieristici), Allegato 3 (analisi funzioni ed attività dei Servizi Infermieristici), Allegato 4 (questionari di clima organizzativo), Allegato 5 (risultati indagine di clima).

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 943/04/99

Responsabile Scientifico Scienza Renato - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Studio della angiogenesi del tessuto nervoso centrale *in vitro*: utilizzo della matrice acellulare omologa di tessuto nervoso come supporto alla coltura di cellule endoteliali del microcircolo”.

La ricerca si proponeva di costruire *in vitro* un sostituto tessutale costituito da matrice acellulare e cellule endoteliali del tessuto nervoso centrale in previsione della realizzazione di una bioprotesi tridimensionale contenente in co-cultura astrociti e cellule endoteliali. La realizzazione di tale bioprotesi potrebbe, infatti, aprire una nuova prospettiva nel trapianto *in vivo* di cellule nervose.

La ricerca doveva essere effettuata sia su ratto che su uomo; a causa di problemi con l'autorizzazione da parte del Comitato Etico, non è stato possibile la ricerca anche sull'uomo.

Sono stati raggiunti con esito positivo i seguenti obiettivi:

- ottenimento della matrice acellulare di tessuto nervoso cerebrale;
- estrazione, coltura e caratterizzazione di cellule endoteliali del neuromicrocircolo cerebrale.

La valutazione dell'interazione delle cellule endoteliali con la matrice acellulare omologa ha dato esito negativo ed ha indirizzato la ricerca verso la costruzione di un modello tridimensionale *in vitro* di colture di cellule endoteliali su polimeri sintetici.

MATERIALI E METODI

Matrice acellulare di tessuto nervoso centrale di ratto

Fonte: ratti Sprague-Dowley.

Tramite rottura della teca cranica si è provveduto all'estrazione del materiale cerebrale. Dopo 2 lavaggi in soluzione salina contenente antibiotici e fungizone (Sigma), della durata di 15 minuti ciascuno, il cervello è stato trattato con il metodo detergente-enzimatico di Meezan modificato dal nostro laboratorio. Il cervello è stato sottoposto a cicli di congelamento-scongelo, ed a 1 o 2 trattamenti con:

- acqua distillata
- sodio deossicolato al 4% (Sigma)
- DNasi I alla concentrazione di 2000 K units (Sigma)

Per verificare il grado di decellularizzazione, alla fine di ogni passaggio è stata effettuata l'analisi istologica su porzioni del preparato. I preparati sono stati fissati con formalina neutra (10% formalina in PBS), disidratati ed inclusi in paraffina. Sono state tagliate sezioni di 5 µm di spessore, ed eseguita la colorazione con ematossilina ed eosina per evidenziare la presenza di cellule.

Estrazione cellule endoteliali del neuromicrocircolo

Per l'estrazione delle cellule è stato seguito il metodo di Abbott et al. modificato dal nostro laboratorio. Il cervello è stato lavato per 2 volte con PBS contenente antibiotico-antimicotico. Successivamente è stata eliminata la materia bianca, ed il materiale cerebrale restante è stato finemente sminuzzato. La sospensione è stata sciacquata in soluzione salina, in modo da allontanare le restanti parti grasse.

Il materiale cerebrale è stato immerso in una soluzione salina contenente collagenasi/disipasi (0,1%, Boehringer), HEPES (10mM, Sigma), e DNasi I (20 unità/ml) (Sigma); quest'ultimo per degradare il DNA liberato dalle cellule rotte. Per separare i microvasi dalle altre componenti cellulari, la matrice è stata lasciata degradare, in agitazione, per 1 h. a 37°C.

La soluzione è stata mescolata fino ad ottenere un composto omogeneo. La sospensione è stata centrifugata per 5 minuti a 2100 rpm. Il surnatante è stato rimosso, il pellet risospeso in gradiente di BSA 25%, in PBS e 10mM HEPES, e la sospensione è stata centrifugata 15 minuti a 2740 rpm. Questo per separare i frammenti di capillari (più pesanti) da mielina, neuroni, astrociti ed altri residui cellulari (più leggeri). Gli strati superiori sono stati rimossi ed il pellet è stato risospeso in PBS. Successivamente la soluzione è stata centrifugata 5 minuti a 2100 rpm. Il surnatante è stato eliminato e i capillari frammentati risospesi in una seconda soluzione di collagenasi/disipasi (0,1%, Boehringer), HEPES (10mM) e incubati, con lieve agitazione, per 45 minuti a 37°C. La sospensione è stata centrifugata 5 minuti a 300 rpm. Il pellet è stato seminato in piastre Petri precedentemente trattate con collagene (1 µl/cm²) (Sigma) e fibronectina umana (1 µl/cm²) (Boehringer),

Le cellule sono state coltivate in:

- Endothelial cell growth medium MV2 (Promocell)
- Soluzione antibiotica-antimicotica 1%

- Siero fetale bovino 5%
- Epidermal Growth Factor (EGF) (5ng/ml)
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (0.5ng/ml)
- basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (10ng/ml)
- Idrocortisone (0.2µg/ml)
- R3 IGF-1 (20ng/ml)
- Acido ascorbico (1µg/ml)

Il terreno è stato cambiato a giorni alterni. Le colture sub-confluenti sono state staccate con soluzione tripsina-EDTA 1:1 e ridistribuite in nuove piastre di coltura, precedentemente condizionate con collagene e fibronectina.

Purificazione cellule endoteliali

Per avere una coltura pura di cellule endoteliali è stata fatta una separazione immunomagnetica. Sono state usate biglie magnetiche di polistirene, dynabeads M-450 tosylactivated, ricoperte con uno strato di poliuretano. La superficie di poliuretano è attivata da p-toluenesulfonilcloride che fornisce gruppi reattivi per il legame covalente di proteine (per esempio anticorpi) o altri leganti contenenti gruppi sulfidrilici. Nel nostro caso le biglie sono state condizionate con anticorpo CD31 (Serotec): un anticorpo primario diretto contro un antigene di superficie specifico delle cellule endoteliali.

La metodica per l'utilizzo delle biglie prevede un passaggio di lavaggio delle biglie, uno di condizionamento delle stesse con anticorpo, ed uno di separazione delle cellule.

Il primo passaggio è necessario per equilibrare le biglie nel buffer appropriato (0,1M buffer fosfato pH=7,4), e renderle pronte per il condizionamento con anticorpo.

Durante il secondo passaggio l'anticorpo in concentrazione di $5\mu\text{g}/10^7$ biglie è stato unito alla soluzione delle biglie (concentrazione: $4-10 \times 10^8$ biglie per ml di soluzione finale), e la soluzione è stata incubata per 24 ore a 37°C in continua lieve agitazione. Dopo incubazione, le biglie condizionate sono state lavate in soluzione salina tamponata contenente 0,1% BSA, e quindi conservate a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

Nel terzo passaggio, le cellule, giunte a confluenza, sono state contate, e sospese in un appropriato volume (10^6 cellule/ml) di soluzione salina, contenente 0,1% BSA. Quindi sono state aggiunte alla sospensione le biglie (5 biglie per cellula). Dopo un periodo di incubazione a 4°C , sono stati fatti 4 lavaggi con medium di base, in modo da togliere le cellule non endoteliali, che non hanno interagito con le biglie.

Infine le cellule sono state seminate in piastre Petri, precedentemente trattate con collagene ($1\mu\text{l}/\text{cm}^2$) e fibronectina umana ($1\mu\text{l}/\text{cm}^2$), utilizzando lo stesso terreno di coltura.

Caratterizzazione fenotipica

Per confermare il fenotipo delle colture dopo immunoseparazione è stato utilizzato l'anticorpo anti-fattore di Von Willebrand rabbit anti-human (anticorpo primario) (Dako) evidenziato dalla perossidasi, in quanto il fattore di Von Willebrand è considerato il più significativo marcatore per l'identificazione delle cellule endoteliali stesse.

Le cellule, seminate su vetrino coprioggetto (22x22mm) precedentemente trattato con collagene e fibronectina e giunte a confluenza, sono state lavate 3 volte con PBS, permeabilizzate e fissate per 10 minuti con una soluzione di HCl ed etanolo (1 parte di HCl al 1%, 99 parti di etanolo al 70%). Dopo ulteriore risciacquo con PBS, le cellule sono state trattate per 20 minuti con una soluzione allo 0,5% di BSA in PBS, per bloccare i siti di legame aspecifici ed incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpo primario diluito in una soluzione di PBS e BSA allo 0,5%. Dopo ulteriori 3 lavaggi con soluzione tampone le cellule sono state poste in incubatore per 30 minuti con l'anticorpo secondario anti-rabbit IgG perossidasi-coniugato (Dako) diluito in PBS. A questo punto l'enzima perossidasi è stato fatto reagire con il suo substrato, H_2O_2 0,02%, in presenza del 3-ammino-9-etil-carbazolo (AEC) (disciolto in tampone acetato e dimetil-formamide al 20%), una sostanza cromogena solubile che viene trasformata in un composto insolubile di colore rossastro.

I vetrini sono stati poi risciacquati con acqua distillata per eliminare l'AEC in eccesso.

E' stato sempre condotto, in parallelo, un controllo negativo in cui si è utilizzato lo stesso metodo omettendo l'uso dell'anticorpo primario per valutare eventuali reazioni aspecifiche. Le osservazioni sono effettuate con un microscopio Laborlux S (Leitz), dotato di una telecamera connessa ad un computer.

Valutazione della capacità angiogenica delle cellule endoteliali in vitro

Il matrigel è stato scongelato in ghiaccio a 4°C per una notte e posto in uno strato sottile ($50\mu\text{l}/\text{pz}$) in piastre da 24 pozzetti. Le cellule endoteliali in subcoltura dalla II alla VII sono state seminate ($2,5 \times 10^4$ cellule/ cm^2) su Matrigel con terreno base addizionato del 10% di siero, 1% di soluzione antibiotica-antimicotica con o senza fattore angiogenico bFGF ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). Le cellule sono state quindi incubate per 18h a 37°C , e successivamente fissate in

formaldeide 10% (in PBS) per 24 h. Le colture sono state successivamente osservate con microscopio ottico a contrasto di fase (Leitz).

Interazione delle cellule endoteliali con la matrice

Le cellule endoteliali, giunte a confluenza, sono state seminate sulla matrice acellulare, precedentemente posta in piastre da 24 pozzetti, in concentrazione di $1,0 \times 10^5$ cellule o di $2,1 \times 10^5$ cellule/cm².

Dopo 24, 48 e 72 ore le colture sono state prelevate e fissate con glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0.1M, pH 7.2. Dopo disidratazione con alcoli, critical point dryer e metallizzazione con oro, i preparati sono stati esaminati al microscopio elettronico a scansione (SEM) (Cambridge Stereoscan).

Studio di un modello tridimensionale in vitro di colture di cellule endoteliali su polimeri sintetici

a) Polimeri.

Per questo studio sono stati utilizzati i supporti polimerici costituiti da poli[(bis-alanato etil estere)fosfazene] (PFAIa), poli(d,l-lattide) (PDLLA) e loro miscele nei rapporti 75:25, 50:50 e 25:75, sottoforma di filamenti.

b) Saggio di adesione.

Le cellule endoteliali dalla II alla IV subcoltura sono state seminate (10^5 cell/cm²) sui polimeri (precedentemente condizionati con $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibronectina) in piastre da 24 pozzetti. Dopo incubazione di 3 h, i pozzetti sono stati lavati con PBS per eliminare le eventuali cellule non adese e le colture sono state fissate in formaldeide al 10% (in PBS) per 24 h. Successivamente, dopo lavaggio con PBS le cellule sono state colorate con una soluzione di cresil violetto allo 0.04% in metanolo al 20% per 30 min. L'eccesso di colorante è stato asportato tramite lavaggio con acqua distillata mentre il colorante assorbito dalle cellule è stato estratto con una soluzione di acido citrico 0.1 M in etanolo al 50% sotto continua agitazione.

L'assorbenza è stata determinata a 570 nm con Microplate autoreader EL 13.

I risultati finali, media di tre esperimenti, sono stati espressi come percentuale rispetto alle colture di controllo seminate su polistirene pretrattato con fibronectina. L'analisi statistica è stata effettuata usando il t-test di Student.

c) Determinazione della crescita.

Le cellule endoteliali dalla II alla IV subcoltura sono state seminate ($2,5 \times 10^4$ cell/cm²) sui polimeri (precedentemente condizionati con $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibronectina) in piastre da 24 pozzetti e coltivate per 96h. La vitalità cellulare è stata determinata con un saggio colorimetrico basato sul 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolobromuro, noto come MTT. Brevemente 100 μl di MTT (soluzione madre :5mg/ml) sono stati aggiunti per 1 ml di terreno e le piastre sono state incubate per 4 h. Al termine del periodo di incubazione il colorante assorbito è stato estratto con propan-2-olo acido (0.04M HCl in propan-2-ol), agitando per qualche minuto.

La misurazione dei valori di assorbenza sono state eseguite con Microplate autoreader EL 13 a 570 nm.

I risultati, media di tre esperimenti, sono stati espressi in percentuale rispetto alle colture seminate su polistirene. L'analisi statistica è stata effettuata tramite t-test di Student.

d) Microscopia ESEM.

Le cellule endoteliali (10^5 cellule/cm²) dalla II alla IV subcoltura sono state seminate sul polimero PFAIa/PDLLA (75:25) (precedentemente condizionato con $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibronectina) in piastra da 24 pozzetti. Le cellule sono state incubate per 24 e 72 h. Dopo il periodo di incubazione le colture sono state fissate con soluzione di glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0,1 M (pH 7.2) per 24 h. Successivamente sono state risciacquate per due volte con soluzione di cacodilato 0,1 M e poi con acqua deionizzata.

I campioni sono stati osservati in modalità ESEM, in condizioni in cui si raggiunge l'equilibrio condensazione/evaporazione dell'acqua presente sopra il campione: pressione a 4.2-4.3 bar e una temperatura di 5°C. Le immagini sono ottenute con il modello XL 30 ESEM.

RISULTATI

Per rendere acellulare la matrice extracellulare sono stati necessari quattro cicli di congelamento e scongelamento, seguiti da due cicli del trattamento sopra menzionato (Fig. 1 e 2 agli atti c/o la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

La tabella 1 mostra i risultati dei trattamenti e dei cicli eseguiti per ogni campione. Tali dati suggeriscono che non è sufficiente prolungare l'azione dei singoli passaggi del trattamento, ma è indispensabile che il tessuto, considerato il suo contenuto lipidico, venga disgregato, tramite congelamento-scongelamento per facilitare la permeazione dei successivi trattamenti.

Tabella 1 : Trattamenti e numero di cicli eseguiti per ogni campione

Campioni	Trattamenti				Risultato
	Cicli congelamento/scongelamento	Acqua distillata	Sodio Deossicolato	Dnasi I	
I	0	18 ore	1 ora	1 5 minuti	+++
II	0	24 ore	1 ora	15 minuti	+++
III	6	18 ore	1 ora e 30 minuti	1 5 minuti	++
rv	4	18 ore	1 ora	1 5 minuti	+
V	4	18 ore	1 ora	15 minuti	0
		Il trattamento è stato ripetuto due volte			

+++ Presenza di molti elementi cellulari +
 ++ Presenza di alcuni elementi cellulari O

Presenza di rari elementi cellulari
 Assenza di elementi cellulari

Estrazione cellule endoteliali del neuromicrocircolo

La metodica di estrazione, ha permesso di ridurre al minimo la presenza di altri tipi cellulari, come fibroblasti, la cui proliferazione è stata ulteriormente contrastata dalla presenza nel terreno di coltura di inibitori della crescita delle cellule non endoteliali.

Al momento della semina la coltura mostra gruppi di cellule endoteliali di aspetto rotondo, associate con i frammenti dei microvasi, generalmente corti ed occasionalmente diramati, poche cellule singole e detriti (Fig.3 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Dopo 1 giorno di coltura, le cellule migrano al di fuori del microvaso, ed assumono un aspetto filiforme (Fig. 4 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale), mentre le cellule singole generalmente muoiono.

Dopo 3-4 giorni il tipo cellulare predominante nella coltura sono cellule fusiformi che si espandono in maniera radiale dai "noduli" (fig. 6 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). Dopo alcuni giorni di coltura è ben visibile l'allineamento parallelo di cellule, le quali sono affiancate le une alle altre con pochi spazi liberi fra loro (fig. 6 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale)

Purificazione cellule endoteliali

Giunta a confluenza la coltura primari, le cellule sono state trattate con le biglie magnetiche condizionate con anticorpo specifico in modo da separare le cellule endoteliali da cellule contaminanti, quali i fibroblasti.

Il terreno di base, servito per fare i lavaggi, non è stato gettato; esso infatti è stato centrifugato per 5 minuti a 1500 rpm per sedimentare eventuali altri tipi cellulari estratti dal neuromicrocircolo. Il pellet, ottenuto, è infatti stato seminato in piastre Petri e coltivate con terreno di coltura usato per le cellule endoteliali. Dopo alcuni giorni di coltura si è evidenziata una coltura mista, senza la presenza di cellule endoteliali.

Le cellule endoteliali sono state seminate in piastre Petri: il giorno successivo all'immunoseparazione le cellule seminate formavano colonie e l'unico tipo cellulare presente è rappresentato da cellule fusiformi (Fig. 7 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). Tale metodo ha permesso di ottenere, in brevi tempi, delle colture contenenti solamente cellule endoteliali.

Caratterizzazione fenotipica

L'identificazione del fenotipo cellulare delle colture dopo immunoseparazione è stato effettuato tramite colorazione immunocitochimica utilizzando un anticorpo diretto contro il fattore di von Willebrand. Quest'ultimo è una glicoproteina che viene esclusivamente prodotta dalle cellule endoteliali e rappresenta una delle componenti principali dell'aggregazione e dell'adesione piastrinica. Come si può osservare dalla figura 8 (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale), tutte le cellule componenti le colture risultavano positive per la presenza di tale fattore.

Valutazione della capacità angiogenica delle cellule endoteliali in vitro

E' stata valutata *in vitro* la capacità delle cellule endoteliali di formare strutture tubulari. A tale scopo le cellule, provenienti dalle varie subcolture, sono state semionate su matrigel e coltivate in presenza e in assenza di un noto fattore angiogenico, l'bFGF. Il matrigel è un estratto solubile della membrana basale del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm di topo e contiene laminina, collagene IV, entactina, proteoglicani, fattori di crescita, collagenasi,

attivatori del plasminogeno ed altri componenti non meglio definiti. Oltre ad essere ampiamente utilizzato come fattore di adesione, crescita e differenziazione cellulare per molti tipi di cellule (Paralkar et al., 1991 ; Taub et al., 1990; Vukicevic et al., 1992), trova applicazione nei saggi di angiogenesi (Donovan et al., 2001).

Come si può osservare nella figura 9 (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale), le colture su matrigel presentavano degli abbozzi di strutture tubulari solo quando seminate su matrigel in presenza del fattore bFGF, mentre le cellule in assenza di stimolazione risultavano isolate o raggruppate in piccole colonie. La capacità di formare strutture simili ai capillari viene mantenuta fino alla V subcoltura.

Interazione delle cellule endoteliali con la matrice

Attraverso l'analisi al SEM è stato evidenziato che dopo 24 ore di incubazione la superficie della matrice non presenta alcuna riendotelizzazione, ma solo qualche gruppo di cellule endoteliali rotondeggianti (Fig 10, 11 e 12 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). Nella stessa fotografia sono ben visibili le biglie che sono rimaste legate alle cellule. Lo stesso risultato si è evidenziato anche dopo un'incubazione di 48 e 72 ore. Tale risultato evidenzia che la matrice acellulare non è un supporto idoneo nel sostenere la crescita cellulare.

Studio di un modello tridimensionale in vitro di colture di cellule endoteliali su polimeri sintetici.

a) Polimeri.

Come supporti per la crescita *in vitro* delle cellule endoteliali sono stati utilizzati polimeri derivanti dall'acido lattico (PLA) e appartenenti alla categoria dei polifosfazeni. Entrambi risultano essere materiali biocompatibili e biodegradabili e pertanto sono stati studiati come matrici per il lento rilascio di farmaci, come membrane per favorire la ricrescita guidata dell'osso o dei nervi periferici (Park et al., 2000; Nordstrom et al., 2001; Langone et al., 1995). Il PLA è già stato utilizzato per la coltivazione *in vitro* di cellule endoteliali corneali (Hadlock et al., 1999), da cordone ombelicale umano (Hsu et al., 1999) e da aorta toracica (Mooney et al., 1996). Non esistono invece in letteratura dati riguardanti per i polifosfazeni che sono stati utilizzati per il rilascio controllato di calcitonina in ratti osteoporotici (Veronese et al., 1999).

In questa ricerca è stata valutata l'efficacia di supporti formati da filamenti di poli(dl-lattide) (POLLA), di poli[(bis-alanato etil estere)fosfazene] (PFAla) o da loro miscele (75:25, 50:50, 25:75) come substrati per la crescita delle cellule endoteliali.

La struttura dei filamenti polimerici è stata analizzata tramite microscopia elettronica a scansione: i filamenti di PFAla hanno uno spessore variabile da 35 a 70 nm, una superficie irregolare ed una struttura interna porosa (Fig 13a agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). I filamenti di PFAla presentano uno spessore variabile da 70 a 100 nm, una superficie abbastanza compatta, sulla quale si possono osservare alcuni fori (Fig. 13b agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). In conclusione, i filamenti di PFAla sono più sottili e meno omogenei di quelli di POLLA e presentano una porosità maggiore.

b) Colture di cellule endoteliali sui polimeri.

Per valutare se i polimeri potessero rappresentare un idoneo supporto per la crescita delle cellule endoteliali e permettessero la formazione di strutture tubulari, sono stati valutati i seguenti parametri: adesione e crescita cellulare. Inoltre le colture sono state osservate tramite ESEM.

Nei saggi di adesione (Fig. 14), tutti i supporti utilizzati hanno indotto significativi ($p < 0.05$ o $p < 0.001$) aumenti nell'adesione cellulare rispetto al polistirene. In particolare, il supporto composto da PFAla/PDLLA 75:25 sembra essere il più idoneo nel sostenere l'adesione cellulare.

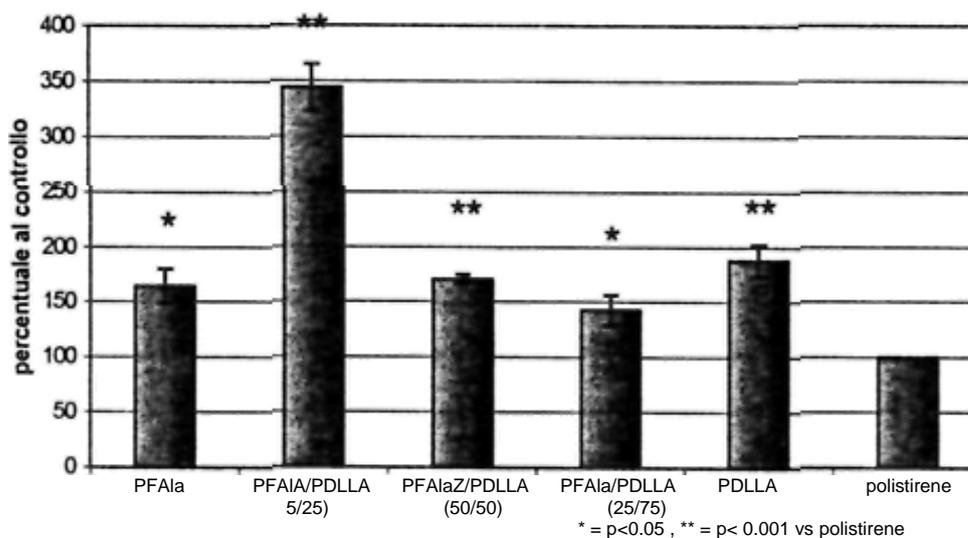


Fig.14: Adesione delle cellule endoteliali sui vari substrati

Nei saggi di crescita (Fig. 15), tutti i supporti contenenti PFAIa hanno determinato aumenti significativi ($p < 0.05$ o $p < 0.001$) nella proliferazione cellulare rispetto al polistirene, mentre il PDLLA non ha avuto alcun effetto.

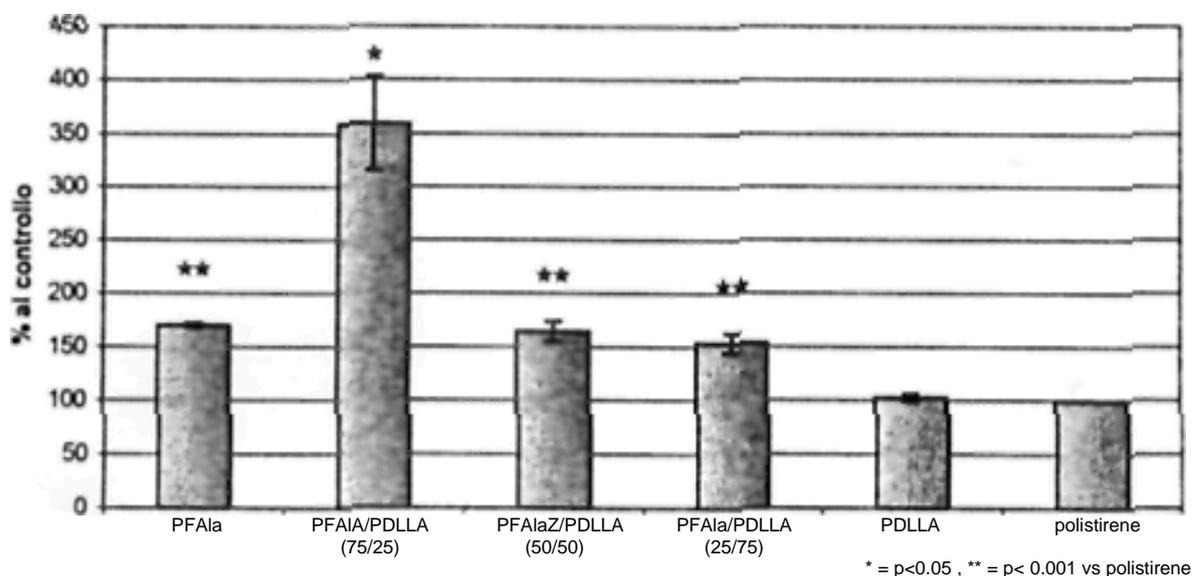


Fig. 15 Crescita delle cellule endoteliali sui vari substrati

Dai dati ottenuti l'adesione e la crescita delle cellule endoteliali sembra essere favorita dalla miscela PFAIa/PDLLA 75:25. La migliore efficacia di questo polimero sembra essere probabilmente legata alla sua struttura porosa.

Infine le colture di cellule endoteliali sul supporto PFAIa/PDLLA 75:25 sono state osservate tramite ESEM. Dopo 24h dalla semina le cellule erano presenti non solo sulla superficie del polimero, ma anche al suo interno. Appaivano rotondeggianti e avviluppate dalla fitta trama di fibre del supporto. Prolungando il tempo di coltura a 72 h si

è potuto notare un aumento della densità cellulare, con presenza di cellule in fase di divisione, ma non si è rilevata la presenza di strutture tubulari (Fig. 16 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

La formazione di strutture simili ai capillari è stata ottenuta da Mooney et al. (1996), che hanno utilizzato co-culture di cellule muscolari di aorta bovina e di cellule endoteliali di analogie origine, aventi come supporto polimerico fibre di PDLA/PLGA rivestite da PGA. In questo caso le cellule muscolari, producendo probabilmente fattori stimolanti l'angiogenesi, favorivano l'organizzazione delle cellule endoteliali in strutture tubulari.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 944/03/99

Responsabile Scientifico Secchi Antonio Giovanni - Ente Proponente Università di Padova

“Studio della fisiopatologia della iperplasia connettivale caratteristica delle malattie blefaro corneo congiuntivali a patogenesi immunitaria più severa, e conseguente valutazione dell'approccio terapeutico più razionale ed efficace”.

Gli obiettivi che il presente progetto si era proposto erano: 1) raccolta di dati epidemiologici, clinici e campioni biologici da pazienti affetti da gravi forme di cheratocongiuntivite di tipo allergico. 2) Determinazione dei livelli di citochine ed enzimi nei campioni raccolti. 3) Studi su tessuti e in vitro su cellule in coltura riguardanti le caratteristiche della fibrosi tessutale e del rimodellamento e corrispettivo modello in vitro. 4) Inibizione in vitro della produzione ed espressione di fattori proinfiammatori da parte di farmaci antiinfiammatori steroidei, non steroidei ed antiallergici.

Le congiuntiviti allergiche, in particolare le forme croniche di cheratocongiuntivite primaverile (VKC) e atopica (AKC) e le blefaro-cheratocongiuntiviti allergiche sono tradizionalmente considerate conseguenti a reazioni di ipersensibilità IgE mediata. Si tratta di malattie oculari gravi ed invalidanti. E' stato creato un database per la raccolta di dati clinici ed epidemiologici che ha portato ad una maggior conoscenza delle caratteristiche cliniche e biomorali dei pazienti affetti.

La presenza a livello dei tessuti di linfociti a fenotipo Th2, cioè di linfociti che producono citochine IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e GM-CSF, conferma la patogenesi allergica di queste malattie. Lo sbilanciamento fra le due maggiori sottopopolazioni linfocitarie helper, Th1 e Th2, e' responsabile della iperattivazione dei Th2 e della conseguente ipersensibilità specifica ed aspecifica delle mucose. Abbiamo dimostrato che nel 67% dei pazienti affetti da VKC sono presenti a livello liquido lacrimale cellule CD4+/IL4+ (Th2). In uno studio parallelo, sono stati derivati da biopsie congiuntivali di pazienti affetti da VKC, cloni Th2, che esprimevano IL-4 e non interferone gamma (INFg). Inoltre, abbiamo derivato da tessuti congiuntivali e cellule lacrimali linee cellulari T che producevano valori elevati di IL-5 e IL-13 e solo piccole quantità di INFg e IL-2 confermando che la maggior parte di questi linfociti sono di tipo Th2. Nonostante queste patologie siano considerate allergiche per la presenza di una sensibilizzazione specifica, circa nel 50% dei pazienti affetti si riscontra una negatività alla ricerca di IgE specifiche sieriche e locali. Clinicamente e istologicamente entrambe le popolazioni di pazienti (IgE+ e IgE-) presentano la stessa malattia. Pertanto meccanismi non IgE-mediati accompagnano o simulano la reazione allergica.

Una delle caratteristiche principali delle congiuntiviti allergiche croniche e' la presenza di un numero elevato di eosinofili a livello congiuntivale e del liquido lacrimale. Le chemochine sono potenti agenti chemotattici per le cellule infiammatorie e probabilmente sono responsabili, in combinazione con l'IL-5, della massiva infiltrazione di eosinofili caratteristica di questa malattia. Nelle congiuntiviti allergiche, gli eosinofili svolgono un ruolo primario in quanto la loro attivazione comporta il rilascio di mediatori citotossici responsabili del danno corneale tipico di queste patologie. Le chemochine sono prodotte sia da cellule infiammatorie che da cellule strutturali quali epitelio, fibroblasti ed endotelio vascolare. Nel corso del presente progetto abbiamo riscontrato elevati valori di eotassina-1 e -2 nel liquido lacrimale di pazienti affetti da VKC e AKC. L'eotassina-1, ma non l'eotassina-2, veniva prodotta da fibroblasti congiuntivali stimolati con IL-4, IL-13 e TNFalfa ma non da cellule epiteliali congiuntivali.

L'istamina rimane il mediatore primario della reazione allergica in quanto il 98% dei mediatori rilasciati dalla attivazione dei mastociti e' appunto costituito dalla istamina. Abbiamo evidenziato che l'istamina svolge un ruolo importante non solo nell'induzione clinica della fase allergica immediata (prurito ed iperemia oculare) ma anche nel rimodellamento tissutale in quanto stimola l'attività dei fibroblasti. Infatti l'istamina aumenta la proliferazione dei fibroblasti e la produzione del procollagene e riduce l'apoptosi cellulare indotta sperimentalmente dimostrando l'effetto stimolante di questo mediatore sui fibroblasti.

Le profonde modificazioni anatomiche e funzionali che si verificano nel corso di queste malattie a decorso cronico suggeriscono che parallelamente ai processi infiammatori si verifichi una attivazione di sistemi enzimatici quali

elastasi, serine-proteasi, e metalloproteasi (MPP) che innescano sia il rimodellamento dei tessuti e la produzione di nuovo collagene con conseguente fibrosi. Abbiamo dimostrato la presenza nei tessuti di una quantità abnorme di collagene che presenta delle modificazioni rispetto al tessuto normale. La tipologia e le proporzioni tra collagene e matrice risulta inoltre marcatamente alterata in corso di patologia. Fattori di crescita, quindi fattori di stimolo alla produzione di diversi elementi della matrice extracellulare e proangiogenici, quali FGF, PDGF e TGFbeta-1, sono stati dimostrati presenti in quantità aumentata nel corso di patologia allergica cronica e capaci di stimolare in vitro le cellule congiuntivali. Inoltre cellule residenti dei tessuti quali cellule epiteliali, fibroblasti e cellule endoteliali vascolari possono essere stimolate da diversi mediatori a produrre esse stesse citochine e fattori proinfiammatori, rendendole cellule primariamente coinvolte nel processo infiammatorio. Infatti le citochine di tipo Th2, IL-4 e IL-13, precedentemente riscontrate iper-esprese nel corso di malattia, stimolano, nel modello in vitro, la produzione del collagene e modificano l'espressione delle metalloproteasi (MMP). A loro volta le MMP, enzimi implicati nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella infiltrazione delle cellule infiammatorie nei tessuti, risultano iperesprese sia in corso di malattia che attivate nel modello in vitro.

L'espressione e la produzione di questi fattori potrebbe essere modulata da nuovi farmaci. Tali modelli permetteranno quindi di valutare l'effetto farmacologico di diverse molecole. Nuovi farmaci antinfiammatori steroidei e non steroidei, farmaci antiallergici, come i nuovi antistaminici a multipla azione, sono stati testati in vitro come inibitori di fattori proinfiammatori riscontrati nelle fasi precedenti. In particolare, alcuni antistaminici si sono rivelati efficaci nell'inibire in vitro la produzione di citochine e l'espressione di molecole di adesione. Interessanti sono i dati in vitro ottenuti dalla esposizione di fibroblasti congiuntivali alla ciclosporina A (CsA), farmaco utilizzato per via topica per il trattamento delle forme più severe di cheratocongiuntivite. La CsA riduce la produzione di citochine pro-infiammatorie e riduce la proliferazione dei fibroblasti congiuntivali. Questi dati confermerebbero il riscontro clinico dell'efficacia della CsA non solo come immunosoppressore, in questo caso, topico ma anche come regolatore del rimodellamento e della fibrosi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 945/05/99

Responsabile Scientifico Sgarabotto Dino - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Tubercolosi ed immigrazione: introduzione della dot (directly observed therapy) e sviluppo di un sistema integrato di incentivazioni alla terapia”.

È il trattamento ambulatoriale che porta a guarigione il paziente affetto da tubercolosi; purtroppo il nostro sistema di follow-up ambulatoriale è insoddisfacente in quanto i dispensari non ci sono più, non si applica la DOTS (Directly Observed Therapy Short course) e le incentivazioni economiche sono limitate.

La DOTS è scarsamente applicata nei paesi più sviluppati con l'eccezione degli USA; presuppone una riorganizzazione sanitaria con servizio infermieristico che si reca a casa del paziente per somministrare la terapia orale tre volte alla settimana per 6-8 mesi. Attualmente i servizi infermieristici territoriali sono ancora lontani da questo tipo di problematiche, per cui è necessario prevedere un aggiornamento specifico sull'argomento.

Le cosiddette incentivazioni economiche sono elargite prevalentemente dall'INPS che fornisce un'indennità tubercolare (variabile circa fra i 150 e 450 Euro al mese) per i pazienti in trattamento anti-TBC che abbiano versato almeno per un anno i contributi e vengano regolarmente ai controlli ambulatoriali. Circa il 40 dei pazienti ne è attualmente escluso essendo extracomunitari o senza permesso di soggiorno o con meno di un anno di contributi. In alternativa, l'USL può dare un contributo - in mancanza di indennità INPS - ai possessori di regolare tessera sanitaria ed in mancanza di altri redditi. Vanno fatte alcune precisazioni sulle incentivazioni economiche:

I medici le considerano vere e proprie incentivazioni al completamento della cura e lo sono soprattutto per le fasce sociali più basse e per chi ne ha diritto.

L'ente erogatore deve verificare che ci siano altre condizioni oltre la TBC e la regolarità nei controlli (un anno di contributi per l'Inps, un reddito assente per l'USL ed il permesso di soggiorno per entrambi)

Ci si deve porre il problema se andare verso un sistema di follow-up ambulatoriale basato sulla DOTS o sulle Incentivazioni economiche esteso a tutti i pazienti con TBC.

L'attuale evoluzione dei servizi infermieristici territoriali rende finalmente possibile la DOTS che non è però stata ancora adottata come scelta di politica sanitaria regionale di cui si facciano carico i responsabili dei servizi infermieristici sul territorio. È difficile pensare ad una estensione delle incentivazioni al 40 che attualmente ne è escluso (politicamente impossibile).

In pratica, se si vuole applicare la DOTS nella cura della TBC si deve predisporre:

- L'infermiere va tre volte alla settimana a casa del paziente che assume la terapia in sua presenza ed eventualmente fa la streptomina im.

- In alternativa il paziente viene ad assumere la terapia in ambulatorio ricevendo un contributo spese-viaggio di 5-10 Euro per volta.

La DOTS continua ad essere l'approccio consigliato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per la cura della TBC ed è effettivamente l'unica possibilità di controllare la TBC MDR che sta emergendo lentamente anche in Italia. L'introduzione della DOTS può migliorare l'attuale percentuale di completamento della terapia. Si allega la documentazione relativa al congresso "Tubercolosi 2003: vecchi problemi e nuovi protagonisti" che è stato accreditato sia per medici che per infermieri durante il quale sono stati presentati i risultati dei dati raccolti sulla cura della TBC a Padova e nel Veneto ed in cui si sono discusse le problematiche organizzative per migliorare in futuro il follow-up dei pazienti con TBC.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 946/04/99

Responsabile Scientifico Sicolo Nicola - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Bioreattore di insule pancreatiche su supporto biologico attivo di matrice acellulare omologa”.

La ricerca dal titolo “Bioreattore di insule pancreatiche su supporto biologico attivo di matrice acellulare omologa” si proponeva di verificare la funzionalità *in vitro* ed *in vivo* di un nuovo tipo di bioreattore pancreatico di insule.

Gli obiettivi del seguente progetto di ricerca sono stati raggiunti e sono di seguito riportati:

- ottenimento di membrane biocompatibili di PVA;
- realizzazione del bioreattore e test di valutazione *in vitro*;
- sperimentazione del bioreattore *in vivo*.

Lo studio è stato attuato mediante l'utilizzo di insule di ratto isolate seminate su matrice acellulare omologa di pancreas a loro volta inserite in una biomembrana di PVA, in grado di mantenere l'isolamento delle insule dalle molecole anticorpali e la libera diffusione del glucosio e dell'insulina.

La funzionalità del bioreattore così formato è stata testata *in vitro* ed *in vivo*.

I risultati ottenuti *in vitro* hanno dimostrato nelle otto settimane livelli di rilascio insulinico tra loro paragonabili; e anche quelle coltivate nel bioreattore hanno mostrato delle buone risposte secretorie dovute ad una diffusione regolare.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti *in vivo* si è potuto constatare che i ratti precedentemente resi diabetici e sottoposti a impianto del bioreattore non hanno raggiunto una insulino-indipendenza, ma solo una riduzione significativa del fabbisogno insulinico giornaliero rispetto ai controlli.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 947/01/99

Responsabile Scientifico Stellin Giovanni - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Il cardiopatico congenito operato: efficacia della correzione precoce, necessità di reintervento e istituzione di registro operatorio”.

Nel corso degli anni di ricerca, il nostro studio è stato mirato alla creazione di una banca dati per l'archiviazione dei pazienti cardiopatici congeniti operati.

Al fine di poter sviluppare la banca dati è stato creato un software per la gestione dei dati anagrafici, clinici ed operatori di ciascun paziente annoverato nello studio. Questo software è stato sviluppato, al fine di uniformare la nomenclatura riguardante le diagnosi preoperatorie; il tipo di interventi chirurgici e le complicanze post-operatorie, in congiunzione con i membri dell'Associazione dei Cardiochirurghi Pediatrici Europei e con alcuni membri dell'Associazione Americana di Cardiochirurgia.

La banca dati Europea si è dimostrata di fondamentale importanza per caratterizzare in modo più adeguato la popolazione oggetto del nostro studio, permettendoci di individuare le reali incidenze delle singole cardiopatie congenite, la morbilità e la mortalità perioperatoria associata alle singole procedure chirurgiche e la qualità di vita dei pazienti a distanza.

Inoltre ci ha consentito di trovare un riscontro statistico, in termini di "outcome" dei pazienti, alla correzione precoce di determinate cardiopatie congenite come la Tetralogia di Fallot, il Canale atrioventricolare completo: si è potuto constatare come la correzione entro i primi tre mesi di vita di tali patologie giovi, in termini di mortalità e morbilità, a questi piccoli pazienti. Dai dati raccolti abbiamo potuto poi estrapolare come le differenti scelte terapeutiche per la medesima patologia possano essere determinanti in termini di sopravvivenza e di qualità di vita per i pazienti.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

La creazione di una banca dati operatoria ha portato alla precisa definizione delle varie categorie di pazienti cardiopatici congeniti operati, permettendo di identificare i diversi fattori di rischio ed i differenti gradi di morbilità e mortalità delle varie categorie considerate. Presso il nostro centro, la definizione di un'unica nomenclatura per le diagnosi, le procedure chirurgiche e le complicanze postoperatorie ha permesso di migliorare il trattamento chirurgico di questi pazienti. Ci ha permesso di stabilire come, la correzione chirurgica in età precoce rispetto alla correzione tardiva, ottenga una diminuzione delle complicanze post-operatorie e ottimizzi il trattamento. Ci ha permesso di capire quanto incida, a lungo termine, il trattamento precoce nel miglioramento della qualità di vita del piccolo paziente cardiopatico, abolendo fenomeni quali il rimodellamento ipertrofico del cuore e i danni secondari agli organi vitali caratteristici di queste patologie.

All'interno della popolazione in esame sono state identificate alcune patologie che beneficiano in modo netto della correzione precoce: il canale atrio-ventricolare comune e la tetralogia di Fallot.

La migliore gestione dei malati nel post-operatorio, prima in terapia intensiva e successivamente in reparto, ha permesso di ridurre le complicanze, sia in termini di qualità che quantità, e di abbattere i tempi di degenza, diminuendo così le spese sostenute dall'Azienda Ospedaliera.

Negli ultimi anni l'introduzione di tecniche chirurgiche mini-invasive, soprattutto, per il trattamento di cardiopatie quali il difetto del setto interatriale e la pervietà del dotto arterioso ci ha consentito di migliorare anche dal punto di vista estetico la qualità di vita soprattutto delle nostre pazienti. Dall'analisi dei dati raccolti è emerso come le tecniche mini-invasive, rispetto a quelle tradizionali, permettano la riduzione del dolore postoperatorio, delle trasfusioni ematiche, dei tempi di ospedalizzazione e un miglioramento dal punto di vista estetico della cicatrice chirurgica.

Il quotidiano confronto dei dati ci permette di valutare i nostri risultati rispetto a quelli di altri centri italiani ed europei, e di migliorare, non solo utilizzando l'esperienza da noi acquisita negli anni, ma anche l'esperienza esterna.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 948/05/99

Responsabile Scientifico Tatò Luciano - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Verona

“Influenza delle condizioni socio economiche e sanitarie delle famiglie extracomunitarie delle differenti etnie sul peso alla nascita e l'età gestazionale dei neonati”.

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo sui neonati nati nel Triveneto dal 1989 al 2000 compresi, per valutare le dinamiche di nascita nelle regioni dell'Italia nord orientale. I dati inerenti i singoli neonati provenivano dal Centro di Malattie Metaboliche dell'Università di Verona cui fanno capo tutti i punti nascita del Trentino, Veneto e Friuli.

Risultati principali

Sono stati presi in considerazione i seguenti punti:

- 1) andamento delle nascite nel corso degli anni con suddivisione in maschi e femmine. Si è registrata una lieve tendenza all'aumento delle nascite negli ultimi anni; la prosecuzione dello studio consentirà di definire quanto questo sia un fenomeno spontaneo o conseguente all'aumentato tasso di immigrazione nel nostro paese.
- 2) classificazione dei neonati in base al peso in piccoli per età gestazionale (SGA) e macrosomi (LGA) definiti tali secondo gli standard antropometrici dell'Italia Nord Orientale di Fabris et al.. I neonati sono stati analizzati separatamente nei due sessi ed è stato valutato l'andamento della distribuzione per anno.
- 3) categorizzazione dei soggetti extracomunitari e riporto dell'evoluzione nel corso degli anni (tabella 4 e grafico IV: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale). I neonati SGA sembrano mantenere un andamento costante negli anni, con una percentuale di SGA maggiore nelle femmine rispetto ai maschi. Si registra un progressivo e costante incremento dei macrosomi tra i neonati, con la tendenza a raddoppiare nell'arco del decennio studiato. Tale fenomeno si verifica sia nei maschi che nelle femmine con una lieve prevalenza nei primi.

- 4) L'immigrazione è risultata in aumento nelle nostre regioni con picchi in alcuni anni. I movimenti migratori di quest'ultimo decennio mostrano un progressivo incremento di soggetti provenienti dal continente africano; si è evidenziato inoltre un picco di soggetti provenienti dai paesi dell'ex-Jugoslavia nella prima metà degli anni novanta.

Obiettivi conseguiti

I dati che emergono dallo studio, e che necessitano di ulteriori conferme, sembrano delineare un quadro particolarmente interessante per i neonati macrosomi ed i neonati extracomunitari. Per i primi sarà auspicabile monitorare la crescita statura-ponderale nella prima infanzia al fine di registrare ed eventualmente correggere la tendenza al sovrappeso e all'obesità ed ai problemi ad essi correlati con importanti ricadute assistenziali ed economiche; per i secondi sarà utile indagare le abitudini nutrizionali e lo stile di vita legate allo stato socio-economico ed alla cultura, in relazione al paese di residenza.

Ricadute per il Sistema Sanitario Regionale

- a. osservatorio epidemiologico: i dati ottenuti consentono per la prima volta un'analisi della distribuzione delle nascite di tipo qualitativo, cioè specifica per i neonati sottopeso, normopeso o macrosomi, di tutta la regione Veneto in un arco di anni rilevante. Questa è una base utile per eventuali pianificazioni di intervento, strategie preventive e di organizzazione dell'assistenza.
- b. area della prevenzione (pianificazione intervento): l'incremento del numero di neonati macrosomi, unitamente all'aumento esponenziale dell'obesità nella popolazione adulta, suggerisce la necessità di focalizzare l'intervento preventivo nelle fasi di gravidanza e prima infanzia. È stato infatti dimostrata un'associazione tra peso alla nascita, velocità di crescita nel primo anno di vita ed obesità nelle età successive.
- e. assistenza sociale ed educazione sanitaria: il numero crescente di nati da soggetti extracomunitari suggerisce la necessità di apportare modifiche nelle modalità di educazione alla nutrizione che tengano conto delle minoranze etniche e dei loro usi e costumi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 949/02/99

Responsabile Scientifico Terranova Oreste - Ente Proponente Università di Padova

“Progetto di uno screening neoplastico in una popolazione di pazienti anziani istituzionalizzati”.

La maggior parte delle neoplasie colpisce pazienti in età avanzata e l'incidenza dei tumori maligni, globalmente considerati, aumenta con l'avanzare dell'età. Il rischio di cancro sembra essere, quindi, una funzione esponenziale dell'invecchiamento.

Ogni anno i maschi e le femmine di oltre 65 anni, rispettivamente, sono colpiti dal 59% e dal 52% dei nuovi casi di neoplasia.

Questi dati epidemiologici hanno delle motivazioni biologiche che, secondo alcuni Autori, risiedono nel fenomeno stesso dell'invecchiamento. Con il passare degli anni avvengono infatti, una serie di modificazioni delle cellule e dei tessuti che sfociano nel graduale, costante fenomeno della senescenza cellulare. Queste modificazioni sarebbero le stesse che, per motivi ancora oscuri, potrebbero portare all'anomalo processo della trasformazione neoplastica. Senza entrare ulteriormente nel merito, invecchiamento e insorgenza dei tumori riconoscerebbero, in ultima istanza, una origine comune.

Fermo restando che la prevenzione è l'arma più efficace contro le neoplasie e che essa andrebbe attuata il più precocemente possibile nei soggetti a rischio e, possibilmente, nella popolazione in generale, è il soggetto anziano che andrebbe visto in un'ottica particolare che lo consideri elemento ad altissimo rischio di cancro.

Fatte queste premesse, abbiamo notato in questi ultimi anni una importante quota di pazienti anziani, portatori di neoplasie, provenienti da istituti di riposo per anziani.

Le ragioni di questa apparente elevata incidenza potrebbero essere molteplici: particolare attenzione del personale medico e paramedico degli istituti; maggiore disponibilità da parte dell'anziano a rendere partecipi dei propri problemi di salute persone che in qualche modo considera addette a prestazioni di carattere sanitario; maggiore sensibilità del familiare a sintomi o altre manifestazioni, riferite alle visite periodiche e che, in un rapporto quotidiano, verrebbero invece sottovalutate.

Le ragioni di cui sopra vedrebbero quindi l'istituzionalizzazione come un momento positivo per la diagnosi delle malattie neoplastiche nell'anziano.

In realtà non ci sono dati per affermare questo ruolo favorevole, né elementi che permettano di comparare i risultati di eventuali terapie tra soggetti istituzionalizzati e non. Non sappiamo, inoltre se, a parità di incidenza di malattia, la stessa sia colta in uno stadio più precoce o meno in un gruppo o nell'altro di soggetti.

Scopo della nostra ricerca è stato quello di valutare l'utilità di uno screening oncologico in pazienti anziani istituzionalizzati con particolare riferimento alla individuazione precoce delle neoplasie localizzate ai seguenti organi:

- esofago
- stomaco
- fegato
- vie biliari
- pancreas
- colon
- retto-ano
- prostata
- polmone
- mammella
- cute

Si tratta di patologie che colpiscono in maniera particolare l'età geriatrica: alcune si caratterizzano per la sintomatologia molto sfumata che ne rende la diagnosi spesso tardiva, quando la malattia ha già oltrepassato le possibilità di cura radicale.

La diagnosi precoce di queste malattie può consentire, anche in un soggetto anziano istituzionalizzato, l'impostazione di una terapia adeguata con conseguente miglioramento delle possibilità terapeutiche nonché garanzia di una migliore qualità di vita.

Materiali e metodi.

I pazienti oggetto dello studio sono stati dapprima gli ospiti della Casa di Soggiorno "V.S. Breda" e dell'Istituto di Riposo per Anziani; in un secondo tempo abbiamo ottenuto la collaborazione della Casa di Soggiorno per anziani della "Immacolata Concezione" sempre nella città di Padova, per un totale di circa 800 pazienti. Come gruppo di controllo è stato arruolato un numero statisticamente significativo di pazienti di età superiore ai 65 anni afferenti alle strutture ambulatoriali gestite dal nostro Istituto di Clinica Chirurgica Geriatrica.

Il personale coinvolto nella ricerca è stato rappresentato dai Medici della Clinica Chirurgica Geriatrica e dai Medici curanti degli ospiti dei suddetti Istituti.

Le strutture interessate alla ricerca, oltre alla Clinica Chirurgica Geriatrica ed alle Case di Soggiorno, sono state un servizio di diagnostica cito-istologica ed un servizio di radiologia.

Dal 1 ottobre 2000 al 30 marzo 2002, su circa 1000 ospiti, ne sono stati presi in considerazione 250 che sono stati selezionati dal personale medico delle strutture coinvolte. Di ognuno di questi pazienti sono state preparate schede con i dati personali, l'anamnesi e le patologie in atto. I pazienti considerati sono stati sottoposti dai medici del nostro al seguente iter diagnostico:

1. Raccolta anamnestica accurata ed esame obiettivo generale compresa l'esplorazione rettale.
2. Test per la ricerca del sangue occulto fecale.
3. Ogni volta che il test per il sangue occulto è risultato positivo è stata eseguita una colonscopia.
4. In presenza di lesioni prostatiche rilevate con l'esplorazione rettale il paziente è stato sottoposto a visita specialistica urologica.
5. I pazienti con anamnesi a rischio per neoplasia polmonare (fumatori attivi o pregressi; precedenti malattie polmonari) sono stati sottoposti a radiografia standard del torace.
6. La presenza di una sintomatologia indicativa di una patologia a carico delle prime vie digestive è stata indagata con esofagoduodenoscopia ed eventuale ecografia.
7. Tutte le neoformazioni della mammella e delle parti molli sono state sottoposte ad agoaspirato; in caso di risposte dubbie si è proceduto a biopsia ed eventuale tumorectomia.
8. Lesioni cutanee dubbie sono state asportate chirurgicamente a seconda dei casi o presso l'Istituto o presso la Clinica Chirurgica Geriatrica.

Per accertamenti diagnostici ultraspecialistici o per terapie di competenza chirurgica il paziente è stato ricoverato presso la Clinica Chirurgica Geriatrica dove ha completato la stadiazione ed impostato la terapia (con il contributo eventuale di specialisti; urologo, chirurgo polmonare, chirurgo plastico, radioterapista, oncologo medico, ecc.).

Dalla ricerca sono stati esclusi i pazienti portatori noti di neoplasia o che fossero già stati trattati in passato per una malattia neoplastica. Questi ultimi sono stati comunque considerati a pieno titolo da un punto di vista diagnostico-terapeutico onde non creare discriminazioni e ricreare una occasione di follow-up.

Risultati.

Su 250 (148 femmine e 102 maschi) pazienti di età compresa fra i 75 e 101 anni, considerati dal 1 ottobre 2000 al 30 marzo 2002, sono stati individuati i seguenti risultati:

1. Esplorazione rettale sempre negativa per neoplasie.
2. Sangue occulto positivo in 78 casi che hanno portato all'esecuzione di 69 colonscopie e 58 EGDS che in 2 casi hanno portato a rinvenire un carcinoma gastrico ed in 4 casi ad un carcinoma del grosso intestino. In tutti i casi è stato possibile eseguire un intervento di resezione con intenti curativi.
3. Un'ipertrofia prostatica patologica è stata evidenziata in 27 pazienti di cui 7 hanno necessitato di resezione endoscopica per patologia benigna.
4. 83 pazienti sono stati sottoposti a rx torace con rinvenimento in 1 caso di neoplasia polmonare destra che ha portato ad intervento resettivo.
5. Algie addominali o sintomi comunque riferibili a patologie a carico delle prime vie digestive hanno portato all'esecuzione di 32 EGDS (oltre a quelle conseguenti alla positività del sangue occulto) ed a 43 ecografie dell'addome superiore con rinvenimento di 18 coledoliti sintomatiche ed un ulteriore carcinoma gastrico. In tutti i casi è stato eseguito intervento chirurgico.
6. La visita senologica delle 148 donne da noi controllate ha dimostrato noduli mammari in 9 casi ed in 2 casi la positività mammografica ed istologica ha indicato l'intervento di mastectomia terapeutica.
7. L'ispezione della cute ha permesso di asportare 2 basaliomi.

In complesso, quindi, abbiamo riscontrato 12 forme neoplastiche maligne in vari distretti tutte asportate. Abbiamo inoltre potuto sottoporre ad intervento chirurgico 25 pazienti per patologie benigne, sia delle vie biliari che della prostata.

Obiettivi conseguiti e ricadute per il servizio sanitario regionale.

La possibilità di ottenere una diagnosi ed un intervento precoce in circa il 10% di pazienti sottoposto a screening è sicuramente un risultato positivo che deve far riflettere sull'opportunità di una più stretta collaborazione tra strutture ed istituzioni sanitarie.

In termini di ricaduta per il servizio Sanitario Regionale si ritiene che l'individuazione precoce di lesioni precancerose o neoplastiche si traduca in termini di terapia, in interventi con intento curativo ed, in termini assistenziali, in una minore richiesta di ricovero ospedaliero di pazienti con malattia neoplastica in fase avanzata e quindi in una diminuzione delle giornate di degenza.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 951/05/99

Responsabile Scientifico Tramarin Andrea - Ente Proponente ULSS 6 di Vicenza

“Definizione del livello socioeconomico della popolazione immigrata quale fattore di integrazione sociale e di utilizzo dei servizi sanitari”.

Vicenza è la città del Veneto con il più alto numero di immigrati residenti. Non solo. Essa è, in assoluto, la quinta città d'Italia per tasso di immigrazione. Vicenza rappresenta, pertanto, un caso emblematico ed un modello paradigmatico per studiare il fenomeno immigrazione. Lo studio ha avuto come obiettivo la descrizione del livello di integrazione degli immigrati. È stato distribuito dagli operatori dell'Ufficio immigrati del Comune di Vicenza un questionario tradotto in quattro lingue (inglese, francese, arabo, serbo croato). L'integrazione è stata analizzata nelle seguenti aree: familiare, relazionale, lavorativa, religiosa, abitativa, scolastica. Gli indicatori scelti per definire ciascuna delle aree di integrazione sono stati elaborati per mezzo di alberi logici che definivano 4 livelli di integrazione (nulla, bassa, media, alta). Gli indicatori dell'*integrazione familiare* comprendevano: lontananza dai familiari e disagio percepito. Gli indicatori di *integrazione scolastica* evidenziavano i problemi con gli insegnanti e/o i compagni. L'*integrazione sociale* coglieva aspetti quali l'accesso alle strutture sanitarie, la difficoltà percepita nel professare la propria religione. L'*integrazione relazionale* era descritta da indicatori quali la cittadinanza degli amici, la lettura di giornali e la visione della TV italiana. L'*integrazione lavorativa* comprendeva la condizione di occupazione/disoccupazione, lavoro dipendente/in proprio, problemi percepiti con il datore di lavoro e/o con i colleghi italiani. L'*integrazione abitativa* descriveva il tipo di abitazione (proprietà, affitto, amici, ecc.), l'indice di affollamento (n° di persone per abitazione / n° stanze - 1), dotazioni essenziali (WC, acqua corrente, ecc.). I risultati sul livello di integrazione ottenuti sono mostrati nella tabella. L'analisi dei ricoveri e degli accessi al pronto soccorso ha dimostrato che l'IVG, gli infortuni sul lavoro, e le patologie legate all'area materno infantile sono le cause di più frequente ricorso alla struttura sanitaria. Conclusioni: nella città di

Vicenza il fenomeno immigrazione si configura con caratteristiche di stabilità (di permanenza, economica e abitativa) e di scarsa problematicità sociale.

Integrazione	Nulla (%)	Bassa (%)	Media (%)	Alta (%)	Totale (%)
Familiare	23,2	20,5	2,5	53,7	100
Scolastica	2,7	2,7	35,0	59,7	100
Sociale	15,8	21,8	34,7	27,7	100
Relazionale	4,0	27,7	57,5	10,8	100
Lavorativa	4,5	8,5	9,6	77,4	100
Abitativa	16,2	4,4	26,5	52,9	100

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 952/03/99

Responsabile Scientifico Trentin Livio - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Verona

“Meccanismi responsabili dell'alveolite linfocitaria e molecole implicate nel traffico cellulare nel polmone di pazienti con interstiziopatie polmonari”.

Le interstiziopatie polmonari sono affezioni di frequente riscontro clinico caratterizzate dalla presenza di fenomeni infiammatori negli spazi alveolari del polmone e possibile evoluzione verso la fibrosi irreversibile. Una corretta valutazione clinica di sarcoidosi, fibrosi polmonare idiopatica, alveoliti allergiche estrinseche, interstiziopatie associate a malattie autoimmuni non può prescindere da una caratterizzazione degli eventi immunologia che hanno luogo nel polmone e che sono alla base delle diverse fasi della malattia interstiziale.

Grazie alla tecnica del lavaggio broncoalveolare (BAL) negli ultimi anni è stato dimostrato che lo sviluppo dell'alveolite può essere arbitrariamente diviso in tre fasi principali: l'accumulo di cellule immunocompetenti nelle sedi di attività della malattia, l'attivazione funzionale delle cellule helper (Th1 o Th2) da parte delle cellule presentanti Pantigene (quali i macrofagi alveolari), il rilascio in situ di citochine che hanno funzioni multiple e spesso sovrapposte. L'insieme di tali eventi può portare all'organizzazione del processo infiammatorio locale ed, in alcune patologie, alla formazione del granuloma.

La nostra ricerca finalizzata si proponeva di perseguire i seguenti obiettivi:

A) Verificare se i linfociti T polmonari in pazienti affetti da interstiziopatie polmonari presentassero un pattern di crescita o accumulo ristretto a livello del polmone.

Grazie all'impiego di metodiche fenotipiche e molecolari, l'analisi del repertorio dei linfociti T documentava una selezione di alcuni subsets cellulari a livello del polmone in corso di interstiziopatia. Mediante tecniche di biologia molecolare (quali l'analisi di heteroduplex) abbiamo osservato che i linfociti del microambiente polmonare sembravano mostrare un pattern di accumulo oligoclonale, suggerendo la presenza di subsets di linfociti T selezionati dalla pressione antigenica a livello del polmone di pazienti con interstiziopatie polmonari. Dopo una prima osservazione che orientava per la presenza di cloni di linfociti T nel polmone si è andati a donare e successivamente a sequenziare i prodotti di amplificazione della PCR. I dati ottenuti permettevano pertanto di dimostrare con assoluta certezza la presenza di cloni a livello del polmone di pazienti con interstiziopatie polmonari. Inoltre in alcuni casi gli stessi cloni venivano riscontrati anche a livello del sangue periferico. Questo reperto permetteva pertanto di concludere per il fatto che queste malattie coinvolgono non solo il distretto polmonare ma anche il sangue periferico. I risultati di questa ricerca sono stati sottomessi alla pubblicazione.

B) Il secondo obiettivo mirava a verificare il ruolo patogenetico di molecole coinvolte nella migrazione cellulare, appartenenti alla famiglia delle chemochine, nei meccanismi responsabili del traffico cellulare a livello polmonare. In 15 pazienti con alveolite allergica estrinseca (AAE) abbiamo valutato la produzione in situ ed il ruolo patogenetico della chemochina linfotattica "infiammatoria" IP-10/CXCL10. In una prima serie di esperimenti abbiamo dimostrato che i macrofagi alveolari (MA) isolati dai pazienti AAE esprimevano significativi livelli di CXCL10 mentre nei soggetti normali e nei pazienti che non presentano alveolite non è mai documentabile l'espressione di chemochine linfotattiche. Posti in coltura per 24 hr, i MA dei pazienti con AAE rilasciano spontaneamente CXCL10 e CXCL9, che sono in grado di indurre la migrazione in vitro di una linea T CXCR3+. Successivamente è stata valutata in citofluorimetria l'espressione del recettore di IP-10/CXCL10 CXCR3 da parte delle sottopopolazioni T che si accumulano nel microambiente polmonare di questi pazienti, dimostrando che tale recettore veniva espresso dai linfociti T CD8+ polmonari di questi soggetti. I linfociti isolati dal lavaggio broncoalveolare (BAL) sono cellule T CXCR3+ che esprimono IFN-gamma ma non IL-4; esprimono inoltre il recettore per la catena beta2 dell'IL-12 ed una serie di molecole di attivazione. Anche lo studio immunohistologico

delle biopsie polmonari ottenute da pazienti con AAE confermava che le cellule T che infiltrano il parenchima polmonare sono CXCR3. L'insieme di questi dati suggerisce quindi che i linfociti polmonari responsabili dell'alveolite sono cellule Tei attivate. Dal punto di vista funzionale, abbiamo eseguito una serie di studi atti a verificare se l'espressione di tale recettore fosse correlata ad una effettiva capacità migratoria. Abbiamo dimostrato che i linfociti T polmonari erano in grado di migrare in vitro in risposta ai ligandi di CXCR3 e che tale attività migratoria veniva significativamente inibita dal pretrattamento dei linfociti polmonari con un anticorpo monoclonale anti-CXCR3.

In 35 pazienti con sarcoidosi abbiamo valutato i meccanismi che favoriscono l'accumulo di cellule Th1 CD4+ nei siti di attività della malattia. In un primo studio, ancora in corso, abbiamo valutato l'espressione nel polmone dei pazienti con sarcoidosi di CCL20/MIP-3a, una chemochina in grado di reclutare cellule T attivate. Dati preliminari indicano che mRNA di CCL20 è iperespresso da parte dei MA sarcoidei, che rilasciano in vitro CCL20. La chemochina è dosabile nella componente fluida del BAL a dosaggi che rispecchiano l'intensità dell'alveolite. Infine i linfociti T sarcoidei esprimono il recettore di CCL20 CCR6. Sono in corso studi funzionali atti a verificare i meccanismi che portano alla iperproduzione di questa chemochina nella sarcoidosi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 953/05/99

Responsabile Scientifico Turra Sisto - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Proposta di un sistema di classificazione della disabilità funzionale e motoria secondaria a patologia dell'apparato locomotore in età evolutiva”.

Al fine di migliorare la programmazione e la gestione del processo clinico, oltre che di ottimizzarne l'efficienza (massima quantità di assistenza per unità di risorse disponibili), è stato introdotto nel 1994 un nuovo sistema classificativo, cosiddetto isorisorse, in cui i pazienti sono classificati secondo gruppi omogenei di diagnosi (Diagnosis Related Groups o DRGs). Analogamente a quanto già verificato negli USA, ove i DRGs furono introdotti nel 1983, l'introduzione di un sistema prospettico, cioè basato su tariffe predeterminate, ha comportato un incremento del grado di severità delle patologie trattate in regime di degenza ospedaliera coerentemente allo spostamento verso forme di assistenza erogate in regime di day-hospital o ambulatoriale. Il sistema classificativo dei DRGs, pur esibendo una vocazione prevalentemente orientata alla gestione economica ed amministrativa della medicina ospedaliera, si presta anche ad un utilizzo indirizzato alla rilevazione di dati di carattere epidemiologico. Esso però nulla dice riguardo l'appropriatezza e l'efficacia dei percorsi diagnostico-terapeutici in quanto prescinde da ogni considerazione inerente la loro qualità ed adeguatezza.

Esso cioè non contempla alcuna valutazione in ordine a ciò che costituisce la ragione prima dell'atto medico e cioè il ripristino di una condizione di salute assimilabile a quella vigente prima dell'evento morboso.

La chirurgia ortopedica è indirizzata al trattamento delle patologie dell'apparato locomotore che si possono rendere responsabili di condizioni di invalidità funzionale segmentaria o globale avente carattere provvisorio o permanente. Eppure ancora oggi la valutazione clinica routinaria dei risultati avviene sulla base di valutazioni soggettive non riproducibili, non verificabili o comunque caratterizzate da uno scadente *intra-interobserver agreement*. Inoltre tali valutazioni spesso esulano dalla valutazione che il paziente stesso da riguardo l'efficacia dell'atto medico. Negli ultimi anni è andata quindi crescendo negli ortopedici l'esigenza di valutare e registrare i risultati (gli "outcome" degli autori di lingua anglosassone) sia per ragioni di ricerca che di verifica e di governo delle dinamiche cliniche.

La verifica dei risultati, che richiede una valutazione a monte eseguita prima del trattamento (baseline) e a valle dopo il trattamento (follow-up), può essere ottenuta con metodi cosiddetti oggettivi o soggettivi. I primi includono la misurazione di alcuni parametri quali ad esempio una variazione radiografica, della forza muscolare o del movimento articolare; i secondi richiedono la collaborazione del paziente e mirano ad ottenere risposte concernenti la percezione individuale dello stato di salute. Non di rado le valutazioni cosiddette oggettive non collimano con quelle soggettive. Questa discordanza può il più delle volte essere fatta risalire alla incapacità dell'atto medico di venire incontro alle esigenze ritenute prioritarie dal paziente. Inoltre anche parametri apparentemente molto oggettivi quali il dolore ed il range articolare hanno dimostrato di essere spesso non accurati e non riproducibili.

Per tale motivo la maggior parte degli autori concorda sul fatto che la più corretta valutazione degli "outcome" può essere ottenuta tramite sistemi di valutazione che contemplino la rilevazione integrata di parametri sia oggettivi che soggettivi. Per tale motivo in tempi relativamente recenti vanno diffondendosi strumenti di valutazione che si basano su questionari da redigersi a cura del paziente stesso. Si tratta dei cosiddetti "patient-based outcome measure" quali il SF-36 (Ware, 1992), il *Nottingham Health Profile* (Hunt, 1980) e il *Health Assessment Questionnaire (HAQ)* (Fries, 1982). Inoltre l'ampia diffusione della chirurgia protesica degli arti ha

partorito scale di valutazione specifiche per particolari distretti articolari quali il WOMAC (Bellamy, 1988) e l'Oxford Hip and Knee Score (Dawson, 1996 e 1998) ideati per la valutazione dei risultati della protesizzazione dell'anca e del ginocchio. A dispetto della enorme attenzione di cui hanno goduto negli ultimi anni studi focalizzati sulla misurazione dell' "outcome" nell'adulto, minore enfasi ha trovato nella letteratura medica la valutazione dell' "outcome" nell'età pediatrica. I primi tentativi di andare ad una oggettiva valutazione dello stato funzionale del bambino affetto da patologie dell'apparato locomotore sono stati fatti utilizzando questionari rivolti a pazienti adulti e solo parzialmente modificati in funzione dell'età pediatrica (Young NL et al, 1995). Appare comunque ovvio che la valutazione del bambino pone in realtà problematiche specifiche in considerazione della sua età, del suo sviluppo, delle competenze ed abilità motorie maturate nonché della opportunità che sia il genitore a compilare il questionario piuttosto che il bambino (o viceversa). Per queste ragioni sono stati più recentemente introdotti questionari esclusivamente dedicati alla valutazione dei risultati nei pazienti in accrescimento. Nel 1996 Landgraf e collaboratori elaborarono il *Child Health Questionnaire (CHQ)* frutto di un rigoroso progetto in cui aspetti di natura funzionale motoria e valutazioni psicometriche venivano sottoposti ad un accurato processo di validazione statistica. Nel 1997 Ruperto e coll. curano la versione italiana del *Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ)* (Singh G et al, 1990). Quest'ultimo ha mostrato una particolare vocazione nella definizione degli outcome dei pazienti affetti da patologie articolari croniche polidistrettuali quali ad esempio è dato osservare nell'artrite reumatoide giovanile. Del tutto recentemente (1998) il *CHQ* ed il *CHAQ* sono stati affiancati dal "*POSNA Pediatric Musculo-skeletal Functional Outcomes Questionnaire*" redatto a cura della Paediatric Orthopaedic Society of North America (POSNA), organo ufficiale dei chirurghi ortopedici pediatri americani. Il questionario in oggetto, già preliminarmente saggiato in uno studio clinico internazionale multicentrico, ha in se alcuni elementi di originalità in quanto la valutazione del risultato viene in buona parte eseguita dai genitori e dagli stessi piccoli pazienti, sottraendo il giudizio sul risultato finale dalla discrezionalità del curante. Esso inoltre ha mostrato una notevole duttilità dimostrando di poter valutare con adeguatezza la condizione funzionale globale dell'apparato locomotore in un ampio spettro di patologie ortopediche (neurologiche, reumatiche, osteocondrosiche etc.). Su queste basi abbiamo deciso di produrre la versione italiana del "*POSNA Pediatric Musculo-skeletal Functional Outcomes Questionnaire*"

MATERIALE E METODI

Lo studio è stato effettuato su un campione di 20 pazienti affetti da alcune delle più comuni patologie ortopediche aventi carattere di cronicità e/o progressività (sono state quindi escluse dallo studio le lesioni traumatiche dello scheletro). In particolare le patologie oggetto di determinazione funzionale sono state (paresi spastica degli AAIL (3 casi); condrolisi dell'anca (1 caso); Piede torto congenito bilaterale grave e recidivo (2 casi); grave deformità degli arti inferiori in rachitismo renale (2 casi); piede piatto doloroso (3 casi); pseudoartrosi del collo del femore (1 caso); reumatismo articolare cronico (4 casi); epifisiolisi cronica (2 casi); morbo di Perthes (2 casi). Poiché il questionario è applicabile a pazienti in accrescimento che abbiano maturato una sicura autonomia deambulatoria, lo studio è stato effettuato su pazienti che avevano un'età compresa tra i 2 ed i 16 anni. In particolare 10 erano bambini (età compresa tra i 2 ed i 10 anni; età media: 8,5 anni) e 10 erano adolescenti (età compresa tra gli 11 ed i 16 anni; età media: 13,7 anni). Prevaleva il sesso femminile (12 casi su 20). Il questionario americano nella sua formulazione originale prevede una serie di importanti domande atte a valutare la funzionalità degli arti sia superiori che inferiori e l'abilità ad eseguire alcune comuni attività giornaliere ritenute appropriate per l'età, incluse quelle a carattere ricreativo. La presenza di dolore o di inadeguata percezione di comfort motorio e funzionale, lo stato generale di soddisfazione psichica, le aspettative riguardo il trattamento programmato, ed il grado di soddisfazione seguito al trattamento ortopedico sono altri parametri oggetto di valutazione del questionario. Esso prevede un accertamento di base ("*baseline*") differenziato a seconda dell'età in quanto sono previste domande per i soli genitori per i bambini più piccoli e domande rivolte sia ad i genitori che agli adolescenti per i pazienti più grandicelli. In entrambi i casi il tempo richiesto per la somministrazione del test richiede circa 20 minuti. La maggior parte delle domande prevede delle risposte graduate in un range compreso tra 1 e 4 con 1 che indica una attività facile da eseguire; con 2 che indica una attività eseguibile per la maggior parte del tempo; con 3 che indica una attività difficile da eseguirsi e per poco tempo; con 4 indicante una attività che non può essere completamente eseguita neppure per un tempo limitato. Dalla elaborazione matematica di questi parametri si ricava un valore numerico di score compreso tra 0 e 100 ove il valore massimo esprime il massimo livello di abilità funzionale. E' prevista la possibilità che vengano omesse dal paziente o dai genitori alcune risposte sino ad un massimo del 50% del totale delle domande senza che il test perda di significatività. Alla risposta omessa verrà attribuito il valore di score relativo (1, 2, 3 o 4) pari al valore medio calcolato per le domande afferenti allo stesso raggruppamento funzionale (item) di domande (arti superiori e funzionalità fisica: 8 items; capacità di spostamento e mobilità di base: 11 items etc.).

Nel bambino sino al 10° anno di età il questionario è rivolto ai genitori e consta di 114 domande tanto alla prima rilevazione ("baseline") che al controllo (follow-up). Le prime due pagine del questionario sono riservate alla acquisizione dei dati identificativi (numerici) del paziente, alla codificazione della patologia e del trattamento secondo la classificazione internazionale ICD-9 e alla determinazione della sede anatomo topografica della patologia.

Per quanto attiene l'adolescente (dall'undicesimo al diciottesimo anno) le stesse domande del questionario sono rivolte tanto al paziente quanto ai genitori sia alla prima valutazione che al controllo dopo 6 mesi. Anche per l'adolescente le prime due pagine del questionario sono riservate alla acquisizione dei dati identificativi (numerici) del paziente, alla codificazione della patologia e del trattamento secondo la classificazione internazionale [CD-9 e alla determinazione della sede anatomo topografica della patologia. Nell'insieme il questionario riservato all'adolescente consta di 108 domande (vedi allegato) che differiscono parzialmente tra loro nelle due diverse formulazioni (quella rivolta all'adolescente e quella rivolta al suo genitore). Le stesse domande vengono riproposte 6 mesi più tardi in occasione della valutazione di controllo ("*follow-up*"). In ragione della particolare valenza soggettiva dei parametri raccolti e della esperienza maturata dal paziente e dai genitori in occasione della prima valutazione, il questionario di controllo può essere anche somministrato a distanza ed essere così inviato per posta al destinatario della rilevazione funzionale. I dati raccolti vengono successivamente inseriti in un foglio di lavoro formato Excel appositamente predisposto e dal quale viene automaticamente determinato il valore di score che scaturisce da semplici formule matematiche da applicare secondo le istruzioni precisate nelle fotocopie allegate che riproducono le istruzioni originali redatte dalla American Academy of Orthopaedic Surgery.

RISULTATI

Tutti i pazienti a cui è stata richiesta la collaborazione hanno accettato di essere inclusi nel nostro studio prospettico una volta resi edotti circa le finalità perseguite ed essere stati rassicurati circa la tutela della loro privacy. La presentazione del questionario al paziente ed ai suoi genitori ha richiesto un tempo mediamente compreso tra i 5 ed i 10 minuti. Il tempo richiesto per la compilazione del questionario non si è discostato da quello riportato dagli Autori (10-15 minuti). Si tratta di un tempo certamente limitato ma che incontra la disponibilità del paziente solo nei casi ospedalizzati. I ritmi incalzanti dell'attività ambulatoriale rendono invece sostanzialmente inapplicabile (per la mancanza di disponibilità di tempo non solo del paziente, ma anche del personale sanitario) il questionario ai casi trattati in regime ambulatoriale. La percentuale di risposte correttamente compilate è stata del 92% nei questionari riservati ai genitori e dell'84% in quelli in cui la compilazione era riservata agli adolescenti. Il dato di incompleta compilazione è stato più frequente nei pazienti compresi tra i 2 ed i 5 anni. Questo dato è da mettersi in relazione soprattutto a domande che testavano attività (ad esempio sportive) più appropriate per bambini più grandicelli. In tutti i casi la percentuale di risposte corrette era ampiamente eccedente il 50% (limite minimo richiesto per garantire l'attendibilità della rilevazione) Il 100% degli interessati ha portato a termine il questionario al momento dell'arruolamento (baseline) mentre 3 pazienti su 20 (15%) non ha compilato o non ha completato il questionario al momento del controllo sei mesi dopo la prima valutazione (follow-up). Il valore medio di score rilevato al momento della prima osservazione medica è stato di 82 (minimo 53 massimo 95). I valori più bassi di score sono stati registrati nelle patologie a carattere polidistrettuale quali l'artrite reumatoide (valore medio di score 64) e/o globale quale la tetraparesi spastica (valore medio di score 57). Il valore medio di score al termine del trattamento (follow-up a 6 mesi) è stato di 93 (minimo 65 massimo 100). I valori più bassi di score sono stati ottenuti nelle paresi spastiche (valore medio 70). I risultati così acquisiti non sono stati oggetto di valutazione statistica, non tanto in relazione alla relativa esiguità del campione (necessariamente condizionato dalla relativa rarità delle patologie ortopediche oggetto di studio), quanto in relazione alla considerazione che il nostro lavoro ripropone la versione italiana del questionario nordamericano già recentemente validato su scala molto più ampia nell'ambito di un vasto studio multicentrico .

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il "*POSNA Pediatric Musculo-skeletal Functional Outcomes Questionnaire*" è uno strumento di valutazione globale dello stato funzionale del bambino che viene espresso da un valore di score dedotto dalla valutazione della funzionalità degli arti superiori, dalla capacità di movimento e di trasferimento, dall'attività fisica e sportiva, dal livello soggettivo di comfort, dal grado di soddisfazione e di felicità del bambino nonché dalle aspettative nutrite dal bambino e dalla sua famiglia nei confronti del trattamento. La sensibilità e la attendibilità di questo sofisticato strumento di valutazione è risultata molto elevata. Uno degli aspetti più qualificanti del POSNA outcome score è quello di offrire un sistema di valutazione dello stato di salute globale non limitato a singoli distretti anatomici, alla sola funzionalità muscolo scheletrica ma esteso anche alla valutazione della sfera soggettiva e psicologica del bambino e del suo ambito familiare. Inoltre la possibilità di dedurre attraverso le sole risposte del paziente lo stato di salute e di soddisfazione che segue al trattamento, consente non solo di eseguire una valutazione dei risultati che

non soggiace alla discrezionalità del curante, ma anche di somministrare il test di valutazione a distanza (il questionario può essere spedito per posta, essere compilato a domicilio e successivamente essere rispedito al medico curante). Il limite del "POSNA outcome questionnaire" sta se mai nella sua apparente complessità e nella necessaria attenta e consapevole collaborazione del paziente. Le condizioni ideali per somministrare il test sono quindi quelle in cui il paziente è ricoverato e nelle quali è possibile instaurare un rapporto medico paziente soddisfacente ed abbastanza prolungato (esso non si presta cioè ad essere usato per patologie ambulatoriali). Inoltre poiché la prima valutazione (baseline) fa riferimento alle condizioni che precedono il trauma piuttosto che quelle immediatamente ad esso conseguenti, il questionario non si presta ad una adeguata valutazione dei pazienti traumatizzati. Un altro limite è costituito dal fatto che esso si presta meglio a valutare le patologie croniche piuttosto che quelle aventi carattere di acuzie e che, per i limiti di età intrinseci al questionario stesso, questi non possa essere usato per la valutazione del trattamento delle patologie malformative trattate in epoca neonatale o nella prima infanzia.

Nonostante queste limitazioni esso costituisce nella più recente letteratura specialistica lo strumento di valutazione di riferimento per la valutazione dell'outcome funzionale in età pediatrica. Per questo motivo, in un servizio sanitario pubblico sempre più orientato a migliorare la efficacia delle prestazioni e la qualità percepita del trattamento, ci è parso non privo di utilità produrre la versione italiana del questionario americano.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 956/03/99

Responsabile Scientifico Zaccaria Marco - Ente Proponente Università di Padova

“Stress e sistema immunitario: effetti dell'esercizio fisico strenuo e dell'esposizione cronica all'ipossia ipobarica e correlazioni con le alterazioni pneumologiche e gastroenterologiche dell'alta quota”.

Lo studio si è svolto su 13 giovani donne, selezionate in base alla assenza di alterazioni o patologie immunologiche (valutata attraverso uno screening bioumorale e anamnestico) e alle caratteristiche di risposta allo stress (high-responders). Sono state studiate in 4 fasi: a livello del mare, all'arrivo in quota (Piramide, Nepal), dopo 18 giorni di permanenza in quota, e entro una settimana dal ritorno al livello del mare.

I dati endocrino-metabolici dimostrano che l'esposizione all'ipossia ipobarica induce un'elevata attivazione degli ormoni dello stress, in particolare adrenalina, noradrenalina e cortisolo, che aumentano di due-tre volte rispetto ai valori basali. Apparentemente correlata con queste variazioni appare la netta diminuzione della leptina nella fase acuta di esposizione. La risposta di adattamento dell'organismo normalizza solo parzialmente i livelli ormonali, dimostrando che l'effetto stressante dell'esposizione alla quota perdura anche al rientro a livello del mare.

Interessanti appaiono anche le modificazioni dei parametri immunologici, che all'arrivo in quota si modificano mostrando la tendenza a sviluppare linfopenia con la contemporanea riduzione della popolazione di linfociti CD3 e CD4, mentre dopo permanenza prolungata si manifesta una linfocitosi, come evidenziato dall'aumento dei linfociti CD8 e NK CD16/CD56. Diversamente dalle risposte ormonali, al rientro a livello del mare si è osservato un ripristino della situazione riscontrata prima della partenza. Quanto allo studio del pattern di produzione delle citochine, si è registrata un'attivazione prevalente dei linfociti Th1, mentre i linfociti Th2 non hanno presentato sostanziali modificazioni della loro funzione rispetto al livello del mare. Queste modificazioni potrebbero essere rapportabili alle manifestazioni cliniche che si riscontrano in alta quota, quali le patologie dell'apparato respiratorio. Dal punto di vista clinico, lo score di valutazione dei sintomi generali (Lake Louise modificato), ha dimostrato un incremento della sintomatologia gastroenterologica durante le prime fasi di esposizione alla quota (principalmente una lieve riduzione dell'appetito, spesso associata a nausea), riferibile alla presenza di mal di montagna acuto in forma lieve-moderata. Inoltre, dall'esame dei sintomi (in particolare una forma di diarrea non riconducibile a cause tossiche o infettive) la permanenza in quota sembrerebbe indurre una condizione di ridotta capacità di assorbimento da parte dell'intestino. Alcuni dei dosaggi previsti, data la complessità delle metodiche, sono ancora in corso di esecuzione, ma dai dati finora raccolti possiamo confermare che anche per quanto concerne la donna l'ipossia ipobarica può rappresentare un buon modello sperimentale di stress "fisiologico", come dimostrato dall'importante attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e del sistema nervoso simpatico, e dalle altre risposte ormonali e metaboliche correlate, in queste condizioni di stress, tuttavia, la risposta immunitaria appare abbastanza peculiare e comunque diversa da quella che si può riscontrare a seguito di uno sforzo intenso e prolungato. Infatti, dopo una iniziale depressione linfocitaria, si osserva una linfocitosi, sostenuta principalmente da cellule CD8, un aumento delle cellule NK, ed uno squilibrio del pattern di produzione citochimica Th1/Th2. Questi dati, che dovranno essere completati con l'analisi dell'attivazione della trascrizione genica, potrebbero fornirci spunti interessanti relativamente agli aspetti fisiopatologici di alcune condizioni cliniche e dei problemi di salute che si registrano in determinate condizioni ambientali.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

L'alta quota si è confermata anche nella donna una condizione di elevato stress che è in grado di stimolare il sistema neuroendocrino. Essa modifica inoltre la funzione immunitaria in maniera diversa da quella di altre condizioni di stress note, p. es. l'esercizio fisico.

La sintomatologia clinica (specialmente quella neurologica e gastroenterologica) appare correlabile ad un non adeguato adattamento dell'organismo alla quota, forse in parte dovuto alle modificazioni del sistema immunitario. La conferma delle ipotesi di cui sopra potrebbe aprire interessanti linee di valutazione di questi aspetti anche a quote inferiori (3000-3500m) e fornire indicazioni igienico-comportamentali per i soggetti che vi si recano.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 961/03/99

Responsabile Scientifico Zulian Francesco - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Ruolo delle citochine e delle chemochine e loro interazioni nell'artrite cronica giovanile all'esordio: studio sierologico, cellulare ed immunoistologico”.

ESPRESSIONE DI CXCR3 DA PARTE DEI LINFOCITI DEL SANGUE PERIFERICO E DEL LIQUIDO SINOVIALE

Sono stati studiati 20 bambini affetti da AIG oligoarticolare in fase attiva. In tre pazienti il decorso dell'artrite ha portato all'interessamento di più di 4 articolazioni (forma oligo-estesa), nei rimanenti l'artrite è rimasta localizzata a meno di quattro articolazioni (forma oligoarticolare persistente). Tre di questi pazienti presentavano positività per l'HLA B27 e sono stati classificati come affetti da artrite correlata ad entesite (vedi tabella 1). L'età media all'esordio era 77 mesi (range 13-264 mesi) e la durata media della malattia era 17 mesi (range 2-108 mesi).

Il risultato della ricerca degli anticorpi antinucleo era disponibile in 18 pazienti, ed era positivo in 13. La tipizzazione per l'HLA B27 era stata eseguita in 9 pazienti ed era risultata positiva in quattro.

Di tutti i pazienti sono stati analizzati il liquido sinoviale e il sangue periferico ottenuti contemporaneamente.

L'espressione del CXCR3 è stato studiato mediante tecniche di citofluorimetria con l'utilizzo di anticorpi monoclonali anti CXCR3 (anti-hCXCR3 mAb) marcati con fluoresceina isotiocianato (FITC).

In tutti ad eccezione di tre pazienti i linfociti del liquido sinoviale presentavano una maggior espressione di CXCR3 sia in termini di percentuale di cellule positive, sia come Intensità media di Fluorescenza (MIF). La differenza tra le MIF dei due gruppi era statisticamente significativa ($p=0.01$). In due pazienti, entrambi affetti dalla forma oligoarticolare persistente, la percentuale di cellule CXCR3 positive era maggiore nel liquido sinoviale rispetto al sangue periferico, ma l'intensità dell'espressione aveva un comportamento inverso.

In figura 3 sono illustrati i profili citofluorimetrici di due pazienti rappresentativi.

ATTIVITÀ CHEMIOTATTICA DEL LIQUIDO SINOVIALE

La migrazione di cellule appartenenti al clone CD4+ esprimente elevati livelli di CXCR3 (300-19) in risposta al liquido sinoviale è stata valutata in 4 pazienti.

In tutti gli esperimenti il liquido sinoviale esercitava un spiccatissima attività chemiotattica sui linfociti T 300-19 che presentavano un indice di migrazione da 30 a 50 volte superiore che non se esposti ad un normale medium, come illustrato in figura 4.

Il fatto che tale attività chemiotattica del liquido sinoviale sia dovuta all'interazione del CXCR3 con i suoi ligandi è stato confermato dagli esperimenti di blocking con anticorpi anti CXCR3 e anti IP-10. In entrambi i casi, dopo aggiunta dell'anticorpo bloccante l'attività di migrazione delle cellule 300-19 veniva neutralizzata completamente come evidenziato in figura 5.

In un esperimento è stata studiata la migrazione dei linfociti T ottenuti dal liquido sinoviale in risposta allo stimolo costituito da IP-10. Le cellule presentavano un'attività chemiotattica molto spiccata sia senza stimolazione sia dopo aggiunta di IP-10.

ESPRESSIONE DI CXCR3 E DI IP-10 A LIVELLO DEL TESSUTO SINOVIALE IN CORSO DI AIG VALUTATO CON TECNICHE DI IMMUNOISTOCHEMICA E DETERMINAZIONE DI CXCR3 MRNA CON RT-PCR

E' stato esaminato il tessuto sinoviale ottenuto da 6 bambini tutti affetti da AIG oligoarticolare persistente. L'età media all'esordio dell'AIG in questi bambini era 70.6 mesi (range 34-156 mesi), e la durata di malattia al momento della sinoviectomia era 29.5 mesi (range 2-60 mesi).

La ricerca degli anticorpi antinucleo era stata eseguita in tutti i pazienti ed era risultata positiva in quattro. La tipizzazione HLA B27 era disponibile solo per un paziente ed era negativa.

La membrana sinoviale presentava un'espressione di CXCR3 elevata in tutti i pazienti affetti da AIG, mentre tale espressione era presente, ma in misura minima, nei controlli, come evidenziato in figura 6 A e B. Le cellule che mostravano una intensa espressione di CXCR3 erano non solo i linfociti T (CD3+) dell'infiltrato infiammatorio, ma anche cellule endoteliali (fattore VIII+) e macrofagi (CD68+).

La valutazione con RT-PCR dell'mRNA per CXCR3 ha dimostrato che sia la membrana sinoviale dei pazienti con AIG, sia, in misura minore, il tessuto ottenuto dai controlli esprimevano il CXCR3 mRNA. Un chiarimento circa il significato di tale reperto potrà derivare dall'analisi semiquantitativa del mRNA con PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (PCR-ELISA), che per motivi tecnici, non è stato ancora possibile eseguire.

In una seconda serie di esperimenti è stata eseguita anche la determinazione dell'espressione di IP-10 a livello del tessuto sinoviale degli stessi pazienti. La membrana sinoviale dei pazienti con AIG presentava una positività con intensità moderata, mentre i tessuti di controllo non esprimevano IP-10 (come evidenziato in figura 7A e B agli atti presso la Segreteria Sanità e Sociale).

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 963/06/00

Responsabile Scientifico Barra Salvatore - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Impiego ottimale dell'ago a permanenza per terapia i.v. con valvola d'iniezione (ACP) in medicina interna; studio clinico controllato”.

INTRODUZIONE

Le procedure invasive intravascolari hanno assunto, in questi ultimi anni, una crescente importanza sia nell'ambito diagnostico, che in quello terapeutico.

I dispositivi intravenosi sono indispensabili nella moderna pratica medica e vengono utilizzati sia per monitorare la pressione venosa centrale (PVC) sia, e soprattutto, per somministrare liquidi, farmaci, derivati del sangue e soluzioni per la nutrizione parenterale. Essi possono essere divisi in due principali categorie:

- dispositivi usati per accessi vascolari a breve termine (temporanei);
- dispositivi usati per accessi vascolari a lungo termine (a permanenza).

I primi sono inseriti per via percutanea e rappresentano il metodo di incannulamento venoso (centrale o periferico) più utilizzato. Il posizionamento di tali cateteri prevede la puntura della vena prescelta, attraverso la cute ed i piani sottostanti, sulla guida di punti di repere cutanei ed osteomuscolari (puntura a ciclo coperto).

I secondi, usati per accessi vascolari a lunga durata invece, richiedono usualmente tecniche chirurgiche di inserimento, attraverso l'incisione della cute, l'esposizione del vaso e l'incannulamento dello stesso, ma tutto ciò è legato ad un più elevato rischio di complicanze, soprattutto di infezioni.

Allo scopo di ostacolare la contaminazione del sito di inserzione, può essere utilizzata la tecnica della tunnelizzazione sottocutanea del tratto extravascolare del catetere inserito in vene centrali. Questo metodo consiste nel fare uscire lo stesso dalla cute in un punto lontano dal suo punto di ingresso vascolare.

PREMESSA E OBIETTIVO DELLO STUDIO

In letteratura vi sono dati discordanti per quanto riguarda la sostituzione programmata dei CVP come metodo per prevenirne le complicanze. Secondo le raccomandazioni del Centers of Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta, GA, pubblicate nel 1981 e confermate nel 1996, la sostituzione programmata dei CVP tra le 48 e le 72 ore dall'inserzione riduce in maniera significativa la percentuale di complicanze. Lo studio effettuato da Thomas Bregenzer et al. su un totale di 609 cvp, mantenuti in sede per un tempo compreso tra 1-28 giorni, va in direzione opposta dimostrando che non vi è un incremento di complicanze meccaniche o infettive durante una permanenza dei CVP maggiore di 3 giorni, con un conseguente diminuzione dei costi e di discomfort per il paziente (12). Da alcuni anni sono stati introdotti come modello di CVP delle ago-cannule in teflon con valvola di iniezione (ACP). L'utilizzo di tali presidi oltre ad evitare ai pazienti le ripetute venipunture legate alla terapia endovenosa, non richiede per il mantenimento della loro pervietà né l'infusione continua di soluzioni né l'eparinizzazione. Tuttavia, sino ad oggi, non è mai stato valutato l'impatto che tale presidio può avere sulle infezioni ospedaliere e sull'insorgenza di flebiti; in relazione a questo problema non esiste uno studio clinico controllato che abbia valutato il tempo ottimale per procedere, nel singolo paziente, alla rimozione e all'eventuale sostituzione dell'ACP. L'obiettivo primario dello studio è stato pertanto quello di stabilire il tempo ottimale di permanenza dell'ago cannula, valutando la prevalenza delle complicanze da ACP in relazione al tempo di permanenza.

RISULTATI

Dal mese di Luglio 2001 al mese di Febbraio 2002 sono stati ricoverati presso la Clinica Medica 485 pazienti dei quali 282 sono stati inclusi nello studio e randomizzati nel Gruppo A o nel Gruppo B. Nella Tabella 1 sono

riassunte le cause di esclusione dal protocollo dei 246 pazienti non randomizzati. Dei 282 pazienti 44 sono usciti dallo studio dopo la randomizzazione. In 25 dei 44 pazienti è stata accertata una violazione di protocollo (10 pazienti sono stati inclusi nonostante presentassero uno dei criteri di esclusione, 16 pazienti hanno dovuto rimuovere l'ACP prima dell'intervallo di tempo previsto dal protocollo senza che si fossero verificate delle complicanze, in 7 pazienti la rimozione dell'ACP al tempo previsto dal protocollo non è stata completata con gli accertamenti previsti dal protocollo stesso, 3 pazienti sono deceduti per cause non inerenti le complicanze da ACP prima dei tempi di rimozione dell'ACP previsti dal protocollo, 1 paziente si è volontariamente ritirato dal protocollo dopo il primo posizionamento).

Dei 238 pazienti considerati per l'analisi dei risultati, 113 sono stati randomizzati nel Gruppo A e 125 nel Gruppo B.

Come illustrato nella Tabella 2 i due Gruppi di pazienti risultavano sovrapponibili per età e sesso. La presenza di malattie croniche e quella di neoplasie maligne è risultata sovrapponibile nei due gruppi. Analogamente, nell'ambito la prevalenza delle malattie croniche è risultata sovrapponibile nei due Gruppi. Va tuttavia osservato che nell'ambito delle malattie croniche, la prevalenza di quelle cardiovascolari è risultata più elevata nei pazienti del Gruppo B mentre quella delle nefropatie e delle epatopatie è risultata sovrapponibile nei due Gruppi. Per ciò che concerne trattamenti noti per favorire le infezioni in generale e quelle associate all'ACP in particolare, va osservato come le percentuali di pazienti trattati con chemioterapia nei pazienti del Gruppo B fosse significativamente superiore a quella nei pazienti del Gruppo A. Non sono state invece riscontrate differenze statisticamente significative per ciò che concerne la prevalenza di terapie immunosoppressive e di nutrizione parenterale in vena periferica nei due gruppi.

La durata media della prima ACP posizionata nei pazienti del Gruppo A è risultata pari a 2.67 ± 0.06 giorni. La rimozione dell'ACP dopo tre giorni, come previsto, dal protocollo è avvenuta nel 76.11 % dei casi mentre nel 23.89 % dei casi l'ACP ha dovuto essere rimossa prima del 3 giorni per complicanze.

La durata media della prima ACP posizionata nei pazienti del Gruppo B è risultata pari a 4.14 ± 0.17 giorni. La differenza nella durata della prima ACP tra i due Gruppi di pazienti è risultata statisticamente significativa ($p < 0.001$). Va tuttavia osservato che la rimozione dell'ACP dopo 6 giorni, come previsto dal protocollo, è avvenuta nel 47.2 % dei pazienti. Nel 52.8 % dei pazienti l'ACP è stata rimossa in precedenza per complicanze. In particolare nel 44 % dei casi ciò è avvenuto entro i primi tre giorni dal posizionamento.

Nel corso della degenza una seconda ACP è stata posizionata nel 9.73 % dei pazienti del Gruppo A e nell'11.20 % dei pazienti del Gruppo B. Una terza ACP è stata posizionata nel 3.54 % dei pazienti del Gruppo A e nell'1.60 % dei pazienti del Gruppo B. I due Gruppi sono quindi risultati sovrapponibili per numero di posizionamenti ($p = N.S.$). Analogamente i due Gruppi sono risultati sovrapponibili per il calibro delle ACP posizionate (nel 59.3 %, 33.6% e 6.2% dei pazienti del Gruppo A e nel 65.6%, 26.4% e 6.4% dei pazienti del Gruppo B 20 G, 18 G e 22, rispettivamente, $p = N.S.$). Per l'analisi delle complicanze sono stati quindi utilizzati i dati ottenuti dopo il posizionamento della prima ACP.

Come illustrato dalla Fig. 1 (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale), la prevalenza delle complicanze da ACP, considerate globalmente (ostruzioni, dislocazioni, flebiti e complicanze infettive), dopo il posizionamento della prima ACP è risultata significativamente più elevata nei pazienti del Gruppo B che nei pazienti del Gruppo A (44.25 % vs 67.20 %, $p < 0.001$). Anche la somma delle complicanze per singolo paziente dopo il posizionamento della prima ACP è risultato significativamente più elevato nel Gruppo B che nel Gruppo A. La prevalenza dei pazienti con 2 o più complicanze è risultata infatti pari al 5.31% nel Gruppo A e al 12.00% nei pazienti del Gruppo B ($p < 0.05$),

Considerando separatamente, nell'ambito delle complicanze, quelle locali (ostruzioni, dislocazioni e flebiti) da quelle infettive, va osservato che, dopo il posizionamento della prima ACP, la prevalenza delle flebiti (Fig. 2 Agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) è risultata significativamente più elevata nel Gruppo A (24.78% vs 36.80%, $p < 0.05$). Analogamente anche la prevalenza delle dislocazioni (Fig. 3 agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale) è risultata più elevata nei pazienti del Gruppo B (4.42% vs 13.60%, $p < 0.025$). Non sono state, invece riscontrate differenze statisticamente significative tra i due Gruppi per ciò che concerne la prevalenza delle ostruzioni (4.42% vs 4.80, $p = N.S.$).

Non è stata invece riscontrata una relazione statisticamente significativa tra la comparsa di una flebite e lo sviluppo di una complicanza infettiva nei pazienti dei due Gruppi.

Tabella n° 1- Principali cause di esclusione nei 246 pazienti non randomizzati per lo studio

Cause di esclusione	N° di pazienti esclusi
Rifiuto di partecipare allo studio	35
Incapacità di esprimere un consenso	5
Segni clinici o bioumorali di infezione	111
Terapia antibiotica in atto prima del ricovero	4
Non indicazione a terapia endovenosa	65
Morte o trasferimento nelle prime 12 ore	23
Presenza di un CVC	2
Impossibilità di trovare un accesso venoso	1
Totale	246

Legenda: CVC = catetere venoso centrale

Tabella n° 2: Caratteristiche epidemiologiche e cliniche dei pazienti nei gruppi A e B.

Parametro	Gruppo A	Gruppo B	P
Età (anni)	68.4±1.33	70.89±1.38	N.S.
Sesso (M/F)	54/59	53/72	N.S.
Malattie croniche (%)	91.1%	93.6%	N.S.
m. cardiovascolari (%)	66.4%	79.2%	<0.05
nefropatie (%)	11.5%	8.8%	<0.025
epatopatie (%)	24.8%	31.2%	N.S.
Neoplasie maligne (%)	19.5%	25.5%	N.S.
Chemioterapia (%)	0%	4.0%	N.S.
T. immunosoppressiva (%)	2.6%	3.2%	N.S.
Nutrizione parenterale	14.2%	20.0%	N.S.

Legenda: m = malattie ; T = terapie ; p = confronto tra il Gruppo A e il Gruppo B; N.S. = non significativo; Chemioterapia e T.immunosoppressiva si riferiscono a dati anamnestici prima della randomizzazione ; Nutrizione parenterale significa nutrizione in vena periferica con soluzioni glucosate > 5 % e/o con emulsioni lipidichee/o soluzioni di aminoacidi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 965/06/00

Responsabile Scientifico Bordin Sandro - Ente Proponente Associazione Agenzia per la Sanità Veneto

“Progetto sugli standard di accreditamento di eccellenza relativo alle strutture sanitarie veneto pubbliche e private”.

Dalla imponente mole di lavoro svolta per coinvolgere cittadini ed operatori sanitari e dalle attività effettuate a livello sperimentale possiamo sicuramente concludere per una positività dell'iniziativa di ricerca.

Molte delle intuizioni scaturite dalle riflessioni dei soci aderenti al gruppo di lavoro VENETO ACCREDITAMENTO SANITARIO sono state recepite da moltissime AZIENDE ULSS ed in particolar modo dalla Regione del Veneto che ha addirittura creato una AGENZIA REGIONALE PER LA SANITA' proprio con l'obiettivo di migliorare la qualità dei servizi.

Un accreditamento sanitario di eccellenza deve pertanto rispondere a tutti i requisiti previsti nelle certificazioni di qualità ma nel caso della medicina pubblica riteniamo opportuno suggerire l'inserimento di alcuni presupposti che qui andremo ad elencare:

Necessità che tutte le strutture sanitarie di eccellenza prevedano obbligatoriamente ad organizzare per tutti i neoassunti un corso minimo di tre mesi sulle seguenti materie:

- Psicologia della sofferenza
- Tecniche di comunicazioni
- Valore della mission aziendale e del concetto di appartenenza.

Creazione delle figure PROFESSIONALI di affiancamento in ambito sanitario dedicato alla logistica, all'amministrazione ed alla comunicazione :

- Administration Manager
- Logistic Manager
- Communication Manager

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 968/02/00

Responsabile Scientifico Chiarichetti Franca - Ente Proponente ULSS 8 di Asolo

“L'impatto della diagnostica PET (tomografia per emissione di positroni) nella gestione del paziente oncologico”.

PREMESSA

Questa ricerca si basa su dati estrapolati dalla esperienza clinica, ed ha prodotto anche pubblicazioni e presentazioni scientifiche a congressi.

INTRODUZIONE

La malattia oncologica è in crescita nel nostro Paese, ma sono anche in aumento le possibilità di trattamento e le guarigioni. Attualmente, in Italia, ci sono circa 250,000 nuovi ammalati/anno. A questi vanno aggiunti coloro che sono in trattamento. Tutti questi pazienti necessitano di numerose indagini strumentali con costante incremento della domanda, motivata, inoltre, dalla necessità di monitorare la risposta alle terapie. Le normative in ambito di radioprotezione del paziente e giustificazione alle indagini con radiazioni ionizzanti, peraltro, impongono una corretta scelta del tipo di indagine al fine di massimizzare il risultato, a fronte anche di una ridotta radioesposizione per il paziente. La diagnostica oncologica mediante tecnica PET (tomografia per emissione di positroni) è una metodica di imaging funzionale di crescente impatto nella stadiazione e nella ristadiatione di numerosi tumori solidi (quali mammella, melanomi, colon-retto, neoplasie del polmone e del capo/collo), e dei linfomi che, nel loro insieme, rappresentano le forme a più alta incidenza.

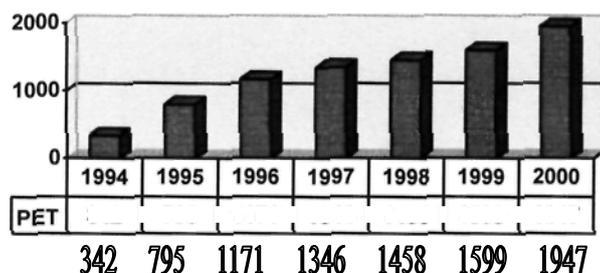
Lo studio di queste neoplasie prevede tradizionalmente l'impiego delle metodiche radiologiche, tra le quali la TAC (tomografia assiale computerizzata) che, pur essendo il principale strumento di diagnosi, non è in grado di fornire l'elemento "funzionale" e quindi di stabilire, correttamente, l'aggressività della malattia. Il possibile risvolto negativo, anche in considerazione delle crescenti potenzialità dei trattamenti, è rappresentato da scelte terapeutiche non corrette.

OBIETTIVI

Il Centro PET di Castelfranco Veneto rappresenta il capostipite, in Italia, dell'impiego di questa diagnostica: la prima strumentazione, nel marzo del 1994, installata in un ospedale pubblico. I dati di attività dimostrano un costante incremento degli esami, dall'apertura del Centro, alla fine dell'anno 2000. Considerando le tipologie di prestazioni, inoltre, se la metodica è stata impiegata, all'inizio, anche in campo cardiologico e neurologico (con percentuali, nei primi due anni, di circa 50% di esami di questo tipo), dal 1998 si è verificato un progressivo aumento della PET in ambito tumorale e tale impiego, alla fine del 2000, ha rappresentato il 95% delle prestazioni.

PRESTAZIONI

PET'94/'00



I principali scopi della nostra ricerca sono stati:

- 1) verificare, retrospettivamente, in quali patologie oncologiche ed in quale momento della malattia, la diagnostica incide maggiormente sulla diagnosi;
- 2) valutare le tempistiche di esecuzione al fine di stabilire una priorità per certe patologie e certe fasi della malattia;
- 3) valutare l'impatto clinico, di tale diagnostica, in termini di percorso terapeutico;
- 4) accertare il possibile risvolto positivo anche nella ridotta radioesposizione al paziente, secondo quanto richiesto dalle normative vigenti.

RISULTATI

Su un totale di 8658 esami, circa 6000 sono stati effettuati a scopo oncologico con le seguenti percentuali, approssimative, per patologia:

40% Tumori

20% neoplasie polmonari

10% tumori del colon-retto

10% tumori del pancreas

5% tumori capo/collo

5% neoplasie mammarie

5% sospetta recidiva di glioma cerebrale

5% miscellanea (tumori dell'apparato riproduttivo, melanomi, neoplasie gastriche ed esofagee, mesoteliomi, sarcomi).

Nella trattazione successiva, sono presi in considerazione i risultati dell'impiego della diagnostica nello studio delle patologie a maggior incidenza e sono citati i lavori scientifici prodotti. Infine, sono riportati i dati ottenuti da un gruppo misto di pazienti, al fine di valutare l'impatto della metodica sulla gestione clinica.

1. LINFOMI

Dopo le prime esperienze, di cui abbiamo pubblicato i risultati (Rubello D. Chierichetti F. Zinzani P.L, Zanco P. Fini A, Bissoli S. Ferlin G. "Diagnostic role of fluorine-18-deoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) in the staging and the follow-up of malignant lymphomas" Biomedicine and Pharmacotherapy, Volume 52, Number 7, 1998 . pp. 344-344). Nella diagnosi della malattia di Hodgkin (HD) e nel (infornon Hodgkin (NHL), dove la metodica ha dimostrato che la stadiazione con PET incide sulla corretta diagnosi dello stadio di malattia, abbiamo studiato il ruolo della PET nella valutazione delle masse residue dopo trattamento. Il primo lavoro, datato 1999, condotto con il gruppo del Prof. Sante Tura (Centro di Ematologia. Istituto Seragnoli, Bologna) su 44 pazienti trattati per NHL. di cui 24 con persistenza di massa addominale residua alla TC e PET negativa per recidiva, ha dimostrato che, soltanto in 1 caso, si è avuta ripresa di malattia.

2. NEOPLASIE POLMONARI

La collaborazione con le Chirurgie Toraciche afferenti, non solo della nostra Azienda, ha dimostrato che la metodica è complementare alla TC nella stadiazione, a fini chirurgici, delle neoplasie polmonari non a piccole cellule (NSCLC). In merito, il nostro Centro è anche stato coinvolto quale relatore, ad un Corso di aggiornamento dell'Associazione Italiana di Medicina Nucleare, allo scopo di insegnare, ai Colleghi, ad utilizzare correttamente la PET in queste patologie (F.Chierichetti, P.L. Zanco. "Tumori del polmone e dell'apparato gastroenterico", Atti del IX° Corso Nazionale di Aggiornamento professionale di Medicina Nucleare, 1997: 455-458). L'esperienza acquisita ha

anche dimostrato l'utilità della diagnostica nel paziente dopo radio/chemioterapia pre-operatoria, con il limite, peraltro, della possibile incidenza di falsi positivi, a breve termine da trattamento radioterapico. *INDICAZIONI: 1. stadiazione di tumore polmonare NSCLC potenzialmente operabile; 2. ristadiazione alla fine delle terapie, almeno 3 mesi dopo trattamento radioterapico.*

3. TUMORI DEL COLON-RETTO

Fin dall'inizio della nostra attività, è stata avviata una esperienza con la radioterapia del POC di Rovigo per la valutazione dell'impatto della metodica nel paziente candidato a chirurgia, dopo trattamento adiuvante chemio/radioterapico. I dati definitivi, pubblicati di recente (Capirci C, Rubello D, Chierichetti F, Crepaldi G, Carpi A, Nicolini A, Mandoliti G, Polico C. "Restaging after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal adenocarcinoma: role of F18-FDG PET", Biomed Pharmacother. 2004 Oct;58(8):451-7) in lavoro esteso, unendo anche la casistica di altri centri PET, hanno dimostrato che la negatività dell'esame, dopo terapia, seleziona i pazienti a buona prognosi che si avvantaggiano del trattamento chirurgico radicale. La gran parte dei pazienti sottoposti a PET nel nostro Centro, peraltro, rientrano tra coloro che sono già stati trattati e per i quali si sospetta la recidiva di malattia sulla base del rialzo dei marcatori ematochimici. Questa indicazione, oltretutto, è tra le prime che il sistema sanitario americano (Medicare) ha approvato, nel 1998, per il rimborso dell'esame. La nostra esperienza ha dimostrato che la PET è la tecnica di prima scelta, ma qualora negativa, il paziente deve essere studiato con TAC, in particolare per lo studio delle possibili metastasi polmonari di piccole dimensioni (sotto 1 cm), non evidenti, per motivi di risoluzione, alla PET.

INDICAZIONI:

- 1. stadiazione di neoplasia avanzata prima di trattamento adiuvante pre-chirurgico;*
- 2. ristadiazione alla fine delle terapie, per decisione di operabilità;*
- 3. ricerca di recidiva in presenza di rialzo dei marcatori ematochimici..*

4. TUMORI DEL PANCREAS

Grazie alla collaborazione del gruppo di Chirurgia pancreatica del Prof. Sergio Pedrazzoli, sono stati prodotti numerosi lavori scientifici che hanno evidenziato, nel paziente portatore di lesione o sospetta lesione pancreatica in storia di pancreatite, che la metodica è superiore alla TAC ed alla RM nella identificazione della neoplasia maligna (C. Sperti, C. Pasquali, A. Canton, A. Ferronato, F. Chierichetti, G. Ferlin, S. Pedrazzoli. "18F-FDG PET imaging in the differential diagnosis of pancreatic cystic neoplasms", Ital J Gastroent and Hepatol 1998, voi. 30 (suppl. 1): A1 7). Applicando una tecnica di tipo semi-quantitativo (calcolo del SUV, Standardized Uptake Value), che consente di ottenere una valutazione "numerica" che, pertanto, va oltre la sola lettura visiva delle immagini, abbiamo recentemente dimostrato, chiudendo una ampia casistica ed un lungo follow up (Sperti C, Pasquali C, Chierichetti F, Ferronato A, Decet G, Pedrazzoli S. "18-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in predicting survival of patients with pancreatic carcinoma.", J Gastrointest Surg. 2003 Dec;7(8):953-9), che l'esame è altamente significativo per cancro quando il valore del SUV supera 3.5 e che, in presenza di valori oltre 4.0 la sopravvivenza è significativamente ridotta, a parità di trattamenti. *INDICAZIONI: 1. studio di lesione pancreatica accertata alle altre metodiche; 2. valutazione attività metabolica del pancreas in paziente con pregressa pancreatite.*

5. L'IMPATTO SULLA GESTIONE DEL PAZIENTE

Dati di letteratura, prendendo in considerazione tutte le neoplasie per le quali è dimostrato l'impiego della metodica, evidenziano che la sua accuratezza diagnostica è 8-43% più elevata, rispetto alle procedure di imaging convenzionale, nella stadiazione e nella ristadiazione della malattia tumorale.

Ma qual'è il suo impatto globale nella gestione del paziente?

Abbiamo valutato retrospettivamente, nella nostra casistica, 287 pazienti con pregressa malattia oncologica (principalmente polmone, mammella e colon-retto) e li abbiamo divisi in due gruppi: gruppo A (123) con sospetta/accertata progressione di malattia su base strumentale o di aumento dei marcatori; gruppo B (164) con sospetto clinico di progressione senza evidenza, alle altre indagini strumentali, di lesione secondaria/recidiva. Il tempo medio di follow up è stato di 9-48 mesi.

Quasi tutte le lesioni sono state dimostrate su base istologica.

Nel gruppo A la PET ha correttamente identificato le sedi di recidiva in tutti, ma in 33/123 (26.8%) ha dimostrato altre sedi di malattia, oltre a quella evidente o sospetta alle altre indagini e, pertanto, il paziente non è stato avviato a chirurgia, bensì a trattamento medico.

Nel gruppo B la PET era positiva per recidiva in 138/164 (84%) dimostrando una lesione operabile (111 casi) o più sedi di malattia (27 casi). In 25/164 la PET non ha dimostrato sedi di malattia e tra questi, in realtà, 2 pazienti avevano metastasi, accertate successivamente (polmone e fegato con primitività, rispettivamente, mammaria e intestinale). 261 pazienti sono stati alla fine trattati: 201 sottoposti a chirurgia e 60 a chemioterapia.

Tra questi ultimi, 33 erano già candidati a chirurgia che, sulla scorta del dato PET, non è stata eseguita.

Globalmente, i nostri dati dimostrano che l'impiego della metodica ha cambiato il percorso terapeutico in oltre il 50% dei casi.

CONSIDERAZIONI FINALI

Questa ricerca è stata condotta con una strumentazione datata 1994, di non elevata risoluzione e, ciononostante, ha dimostrato di incidere pesantemente sulla gestione del paziente, indirizzando anche al trattamento più appropriato;

1. verosimilmente, questi risultati possono incidere sui costi di gestione della malattia, specie se si considerano i costi di un intervento chirurgico ed i suoi possibili rischi per il paziente;

2. nel corso della malattia tumorale, vengono eseguite ripetute indagini, non tutte innocue, in considerazione della radioesposizione. L'utilizzo di una metodica come la PET, che eroga, rispetto alla tradizionale TAC, ridotta radioattività (dai 20-40 mSv per un TAC addome diagnostica, ai 15 mSv di una PET che comprende lo studio di collo, torace ed addome in un'unica seduta) e che ha elevata accuratezza, imporrà una revisione delle linee guida, in merito all'impiego della diagnostica strumentale, nella gran parte dei tumori solidi.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 971/06/00

Responsabile Scientifico Faronato Pier Paolo - Ente Proponente ULSS 2 di Feltre

“Studio policentrico sull'impiego dei dispositivi medici poliuso e sulla sterilizzazione dei monouso: quale sicurezza per il paziente, quale qualità del prodotto, quali costi per le ULSS”.

Introduzione

Il progetto "Inventario e Verifica dello Strumentario Chirurgico" è nato dall'esigenza della ULSS 2 di Feltre di migliorare la gestione dello strumentario chirurgico in dotazione alle varie Sale Operatorie attraverso un lavoro di inventario.

Per soddisfare tale esigenza Medicon e Medival hanno proposto l'applicazione di un programma specifico già sperimentato con successo in diversi ospedali tedeschi.

Questo programma fornisce inoltre delle indicazioni utili a razionalizzare le varie procedure inerenti la gestione dello strumentario chirurgico.

La collaborazione da parte Medicon/Medival alla realizzazione del Progetto è stata offerta a titolo completamente gratuito e senza alcun obbligo da parte della ULSS.

Scopo ed Obiettivi del Progetto

Dalla attuazione del Progetto, la ULSS 2 di Feltre si attendeva di ottenere :

- un inventario preciso dello strumentario chirurgico in utilizzo presso le sale operatorie delle varie specialità chirurgiche;
- una verifica dello stato e della funzionalità dello strumentario stesso;
- eventuali suggerimenti per una migliore gestione.

Metodologia

La pratica attuazione del Progetto ha previsto tre diverse fasi:

1. la raccolta dati sul campo (i singoli reparti operatori);
2. la elaborazione dei dati ottenuti;
3. la presentazione dei risultati e delle conclusioni.

Raccolta dati

Nella prima fase si è proceduto alla verifica degli strumenti relativi a ciascuna specialità chirurgica. Ogni contenitore di strumentario è stato misurato, pesato, fotografato e catalogato in base allo schema previsto.

Ogni singolo strumento è stato quindi individuato, catalogato ed esaminato in ogni dettaglio identificativo, strutturale e funzionale, maneggiandolo con la massima cura e attenzione, e ricostituendo infine il contenitore nel suo stato originale.

Gli strumenti rilevati non perfettamente idonei sono stati documentati anche fotograficamente.

Elaborazione dei dati

Tutti i dati raccolti (comprese tutte le fotografie digitali) sono stati inseriti attraverso un software dedicato in personal computer portatili in dotazione al personale Medicon/Medival e sono stati successivamente riorganizzati, anche a fini statistici, presso le rispettive sedi aziendali.

Risultati e conclusioni

Il risultato finale è presentato in un CD-ROM contenente le liste (tabelle in formato Excel) dello strumentario di ogni contenitore ispezionato, la documentazione fotografica (in formato jpg) e il presente documento (in formato Word).

Tali informazioni danno una fotografia dello stato dell'intero strumentario chirurgico dell'ospedale alla data dell'8 Maggio 2003, ed analizzano le varie situazioni e problematiche riscontrate.

Le tabelle Excel consentono inoltre di mantenere aggiornato l'inventario dello strumentario, rappresentando così un utile strumento per la gestione ed il riordino dello strumentario stesso.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 972/02/00

Responsabile Scientifico Favretti Franco - Ente Proponente ULSS 6 di Vicenza

“Il linfonodo sentinella come indicatore per la linfadenectomia ascellare in pazienti con carcinoma mammario T1”.

INTRODUZIONE

La biopsia del linfonodo sentinella è stata da qualche anno proposta come valido strumento di stadiazione dell'ascella nei casi di neoplasia mammaria di piccole dimensioni. Questa metodica viene utilizzata come alternativa alla dissezione ascellare in considerazione del fatto che un numero non trascurabile di queste pazienti ha linfonodi indenni. Non è tuttavia allo stato attuale noto quale sia in realtà l'impatto di questa metodica sulla prognosi delle pazienti.

Tutti gli studi finora effettuati concordano sulla esistenza di un certo numero di casi falsi negativi, e cioè di casi in cui il linfonodo sentinella è sano ma vi sono in ascella altri linfonodi malati. L'impatto sulla prognosi di queste pazienti con linfonodo sentinella falso negativo non è ancora chiarita. Bisognerà attendere la conclusione degli studi in corso e che trascorra un adeguato periodo di tempo per poter valutare la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale in questo gruppo di pazienti.

Lo studio di seguito presentato è stato proposto essenzialmente per valutare la reperibilità del linfonodo sentinella e non si è posto l'obiettivo di conoscere l'impatto sulla sopravvivenza dato il breve periodo di osservazione.

METODI

Lo studio prevede la randomizzazione delle pazienti con neoplasia mammaria inferiore ai tre centimetri, assenza di metastasi a distanza ed ascella clinicamente negativa in due gruppi.

> GRUPPO A in queste pazienti dopo l'asportazione del linfonodo sentinella si procede a dissezione ascellare completa senza effettuare esami estemporanei

> GRUPPO B in cui il linfonodo sentinella viene esaminato nel corso dell'intervento e la dissezione ascellare è prevista solo in caso di positività del linfonodo sentinella. La dissezione è prevista in seconda istanza nel caso in cui l'esame definitivo dimostri la presenza di metastasi non documentate all'esame estemporaneo.

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad iniezione sulla proiezione cutanea del tumore di albumina marcata con Tc99 il giorno precedente l'intervento e successivamente randomizzate nei due bracci. Nel caso in cui il linfonodo sentinella non sia stato reperito la paziente è stata sottoposta a linfadenectomia classica.

PRESENTAZIONE DEI DATI ED OSSERVAZIONI

Dal 1 Ottobre 1999 al 31 Dicembre 2002 sono state arruolate nello studio 185 pazienti, rispondenti alle caratteristiche già descritte nel disegno dello studio, che sono state così randomizzate:

> Al Gruppo A, sono state assegnate **86** pazienti.

> Al Gruppo B sono state invece assegnate 99 pazienti.

L'ETÀ MEDIA nei due gruppi è praticamente sovrapposte e non ci sono differenze statisticamente significative.
 Gruppo A : 58,61 anni con range da 36 a 80. Gruppo B : 57,45 anni con range da 37 a 77.

LA DOSE DI TRACCIANTE RADIOATTIVO Utilizzato è Stata:

Gruppo A : 34,91 MBq con range 11 - 53

Gruppo B : 34,63 MBq con range 21 - 60

(Anche in questo caso non sono presenti differenze statisticamente significative)

IL TEMPO MEDIO TRASCORSO dell'inoculo del tracciante all'intervento chirurgico è stato:

Gruppo A : 21,26 ore con range 6-28 ore

Gruppo B : 21,09 ore con range 16 - 25 ore

(Non differenze statisticamente significative)

IL NUMERO DI LINFONODI SENTINELLA individuato nei due gruppi è rappresentato nella sottostante tabella e grafico.

	NON TROVATO	1 LINFONODO	2 LINFONODI	3 LINFONODI	4 LINFONODI
Gruppo A	3	38	42	3	0
Gruppo B	2	34	58	4	1

Tabella 1

Dei tre pazienti del Gruppo A in cui non è stato evidenziato il Linfonodo Sentinella, in 2 casi si è verificato un problema organizzativo (1 caso mancata disponibilità della sonda ed in 1 mancata effettuazione dell'inoculo) mentre in una sola paziente la procedura era corretta ma non è stato identificato il Linfonodo Sentinella.

Anche nel Gruppo B si sono verificati due casi in cui il linfonodo sentinella non è stato trovato.

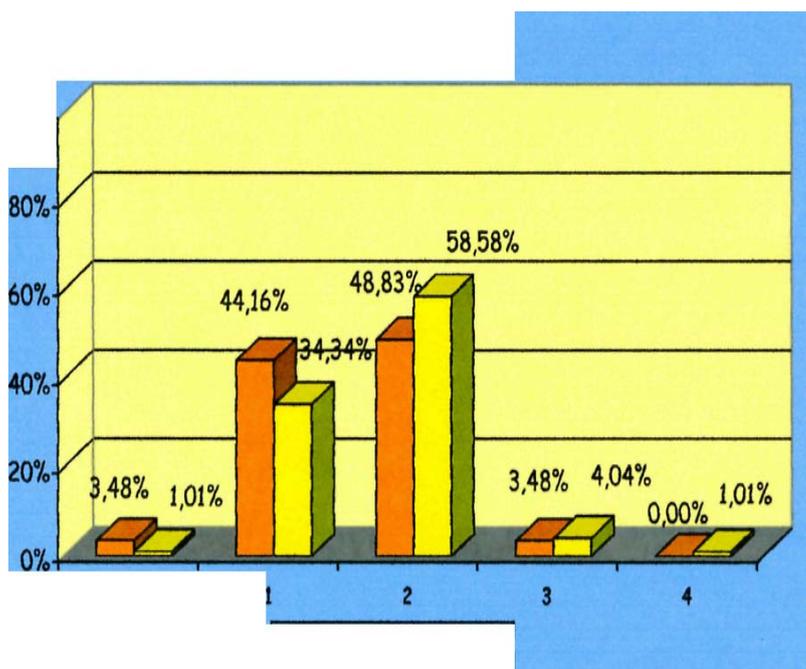
Nel complesso quindi la percentuale di identificazione è stata:

Gruppo A : 96,51%

Gruppo B : 96,96 %

Tale percentuale è leggermente superiore a quella riportata in letteratura che è riportata mediamente intorno al 95%. Ciò potrebbe essere in relazione al fatto che la procedura è stata effettuata da due soli chirurghi con un'esperienza già consolidata.

Numero L.S. ASPORTATI



Arancione = Gruppo A Giallo = Gruppo B

Grafico N° 1 Numero di Linfonodi Sentinella asportati nei due Gruppi espressi in valore percentuale

LA MEDIA DI LINFONODI SENTINELLA trovati nei due gruppi è stata:

Gruppo A : 1,52 con range 0 - 3

Gruppo B : 1,63 con range 0-4

I RISULTATI DELL'ESAME ISTOLOGICO del Linfonodo Sentinella nei due gruppi sono rappresentati, rispettivamente in valori assoluti e percentuali, nei grafici N° 2 – 5. La scelta di non effettuare l'esame estemporaneo sul Linfonodo Sentinella nel Gruppo A è stata dettata dal fatto che tale referto non avrebbe comunque modificato la conduzione dell'intervento ed avrebbe consentito una riduzione dei costi e dei tempi dell'intervento. Tutte queste pazienti sarebbero in ogni caso state sottoposte a dissezione ascellare, indipendentemente dalla risposta del suddetto esame. Anche nel gruppo B in due casi non è stato eseguito l'esame estemporaneo. Nel primo perché il Linfonodo Sentinella non era stato identificato, nel secondo perché erano stati asportati 4 linfonodi e l'esecuzione dell'esame avrebbe richiesto tempi eccessivamente lunghi. Non è escluso, inoltre, che l'identificazione di un numero così alto di linfonodi possa essere considerato come un fallimento della metodica.

Istologia del L.S, nel Gruppo A

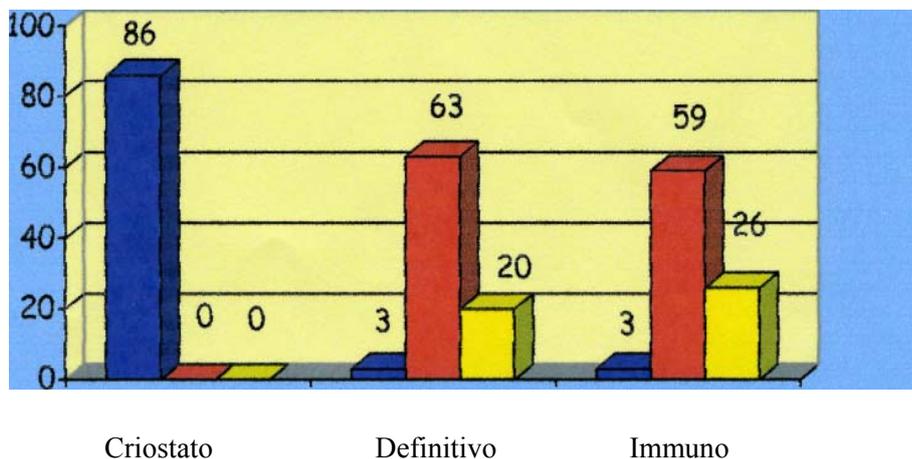


Grafico N° 2 : Positività complessiva dell'esame istologico sul Linfonodo Sentinella nel Gruppo A espresse in valori assoluti.

Istologia del L.S. nei Gruppo B

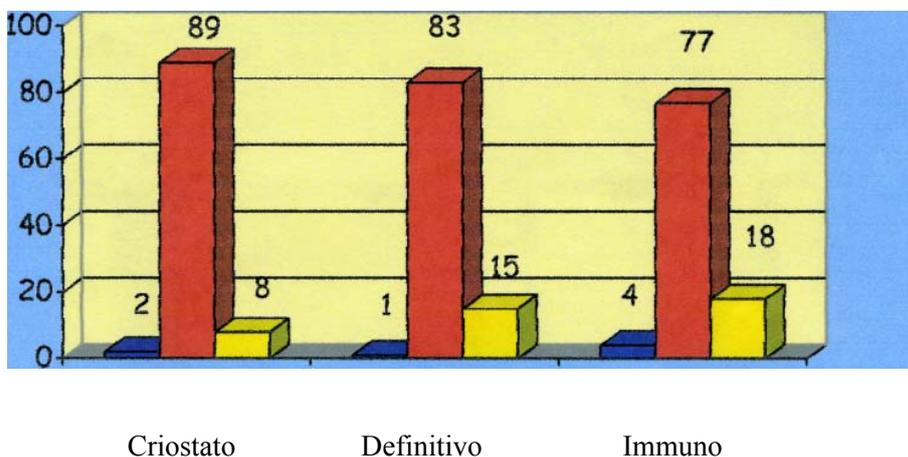


Grafico N° 3 : Positività complessiva dell'esame istologico sul Linfonodo Sentinella nel Gruppo B espresse in valori assoluti

Istologia del L.S. nel Gruppo A
 (Giallo = Positivo Rosso = Negativo Blu = Non Eseguito)

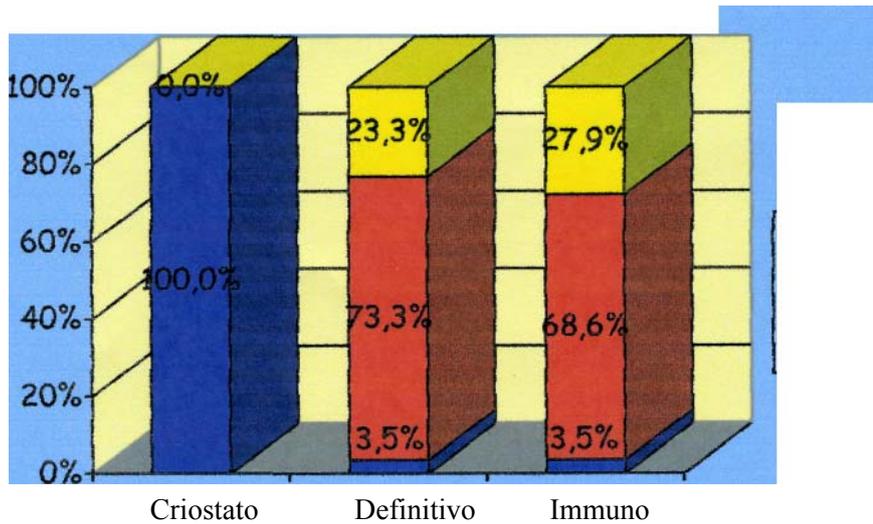


Grafico N° 4 : Positività complessiva dell'esame istologico sul Linfonodo Sentinella nel Gruppo A espresse in valori percentuali

Istologia del L.S. nel Gruppo B
 (Giallo = Positivo Rosso = Negativo Blu = Non Eseguito)

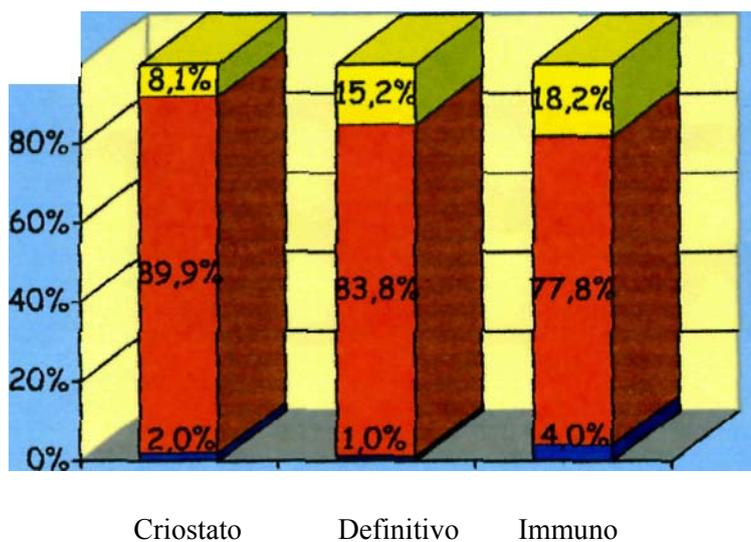


Grafico N° 5 Positività complessiva dell'esame istologico sul linfonodo sentinella nel Gruppo B espresse in valori percentuali

L'approfondimento dell'esame istologico ha portato ad un progressivo aumento del numero di linfonodi positivi in entrambi i gruppi, come indicato nella sottostante tabella 2 e grafico 6 che indicano il totale delle positività finali.

	CRIOSTATO	DEFINITIVO	IMMUNO
Gruppo A	0	20	24 M (+4)
Gruppo B	8	15 (+7)	18 (+3)

Tabella 2 NUMERO DI LINFONODI POSITIVI

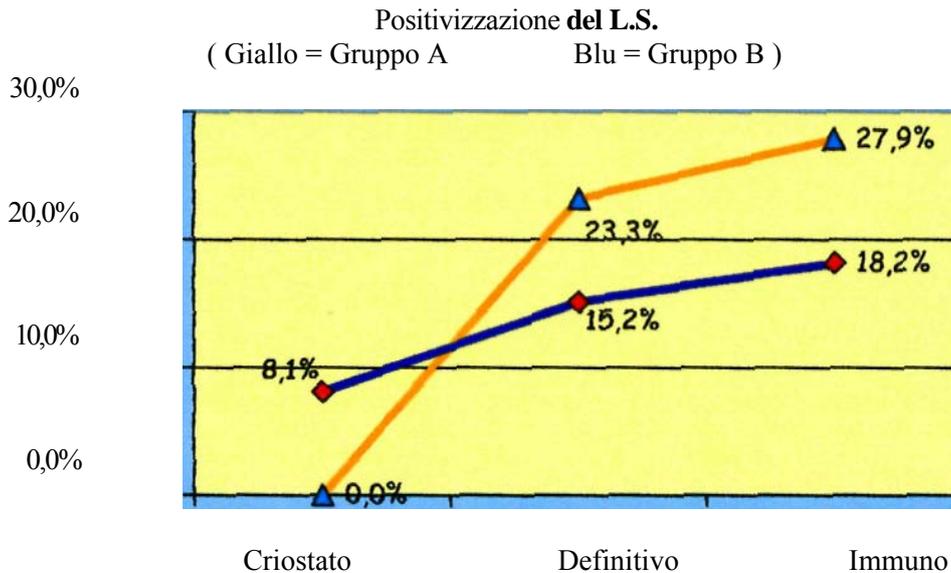


Grafico N°6: Variazione della positività del Linfonodo Sentinella espressa in valori percentuali

Come si nota dalla tabella e dal grafico in 10 (7+3) pazienti (circa 10 %) del Gruppo B è stato necessario effettuare una dissezione ascellare in seconda istanza poiché il Linfonodo Sentinella si è positivizzato solo all'esame definitivo o all'immunoistochimica.

Sembra ragionevole ritenere che in un prossimo futuro sia più corretto. In un gruppo selezionato di pazienti procedere, alla biopsia del Linfonodo Sentinella, possibilmente in anestesia locale, come primo atto terapeutico, pianificando l'intervento definitivo non appena disponibile l'esame completo sul Linfonodo. In tal modo potrebbe essere evitata la necessità di un reintervento maggiore.

LA DISTRIBUZIONE DEL TIPO DI METASTASI evidenziate nel Linfonodo Sentinella è dimostrata nella successiva tabella 3

	CRIOSTATO				DEFINTTIVO				IMMUNOISTOCHEMICA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Gruppo A	-	-	-	-	0	13	6	1	3	17	0*	0*
Gruppo B	0	4	4	0	0	11	4	0	5	14	0*	0

Tabella 3 LEGENDA: 1) ISOLATE CELLULE TUMORALI 2) MICROMETASTASI 3) METASTASI PARZIALE o MASSIVA 4) METASTASI EXTRACAPSULARE (*L'INDAGINE INIMUNOISTOCHEMICA NON È STATA ESEGUITA IN CASO DI METASTASI PARZIALE O MASSIVA)

Come si nota le positivizzazioni nel Gruppo B all'esame definitivo e all'immunoistochimica sono costituite tutte da "Micrometastasi". A queste devono essere aggiunti rispettivamente 3 casi del gruppo A e 5 del gruppo B dove l'immunoistochimica ha evidenziato " isolate cellule tumorali". Questi linfonodi sono stati considerati come negativi e le pazienti non sono state sottoposte a svuotamento ascellare.

Per quanto riguarda invece le "micrometastasi" ovvero le metastasi con dimensioni comprese tra gli 0,2 ed i 2 mm., poiché il loro significato biologico non è ancora completamente chiarito, le pazienti sono state di prassi sottoposte a svuotamento ascellare. Una delle pazienti del gruppo B, a conoscenza del fatto che sono in corso studi che confrontano lo svuotamento con l'astensione da ulteriori interventi, ha tuttavia rifiutato tale procedura.

IL TIPO DI INTERVENTO eseguito nei due gruppi è elencato nella Tabella 4

	TUMORECTOMIA	QUADRANTECTOMIA	MASTECTOMIA
Gruppo A	0	75	10
Gruppo B	3	89	7

Tabella 4

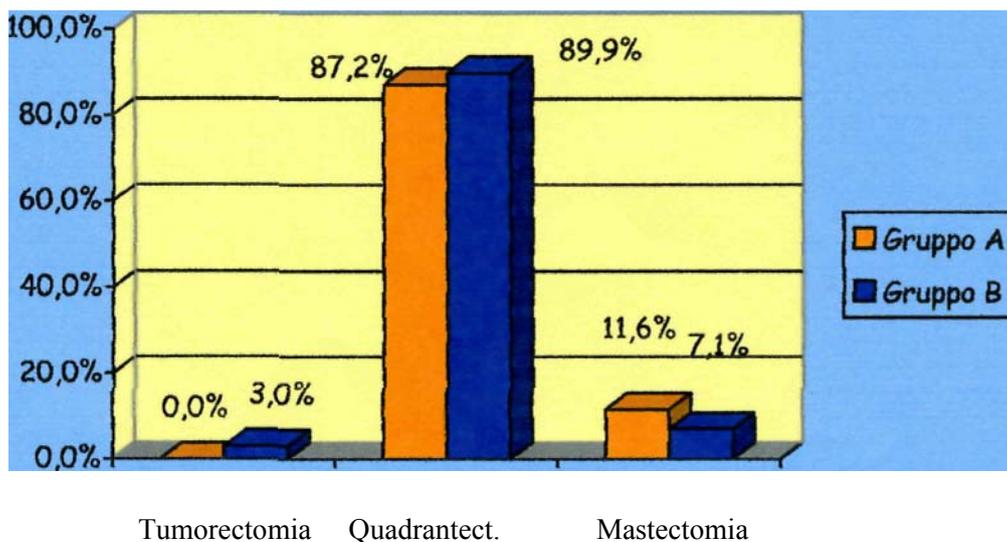


Grafico N° 7: Tipi di intervento espressi in valori percentuali

La tipologia degli interventi è quasi sovrapponibile nei due Gruppi. Si segnala solo una lieve maggior incidenza di mastectomie nel gruppo A .

LA DISTRIBUZIONE DELLE NEOPLASIE nei due Gruppi rispettivamente a carico della mammella destra e sinistra è rappresentata nel Grafico 8.

Nei successivi grafici 9 (A-B) e 10 (A-B) è invece indicata la sede del T suddivisa per gruppo e per lato

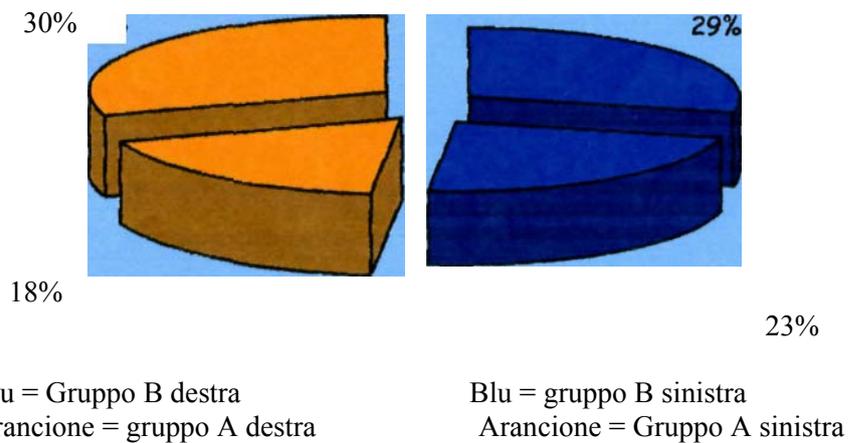
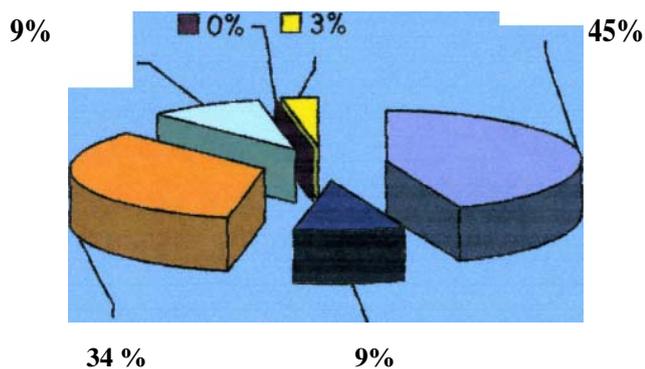


Grafico N° 8 Distribuzione delle neoplasie nella mammella destra e sinistra nei due gruppi

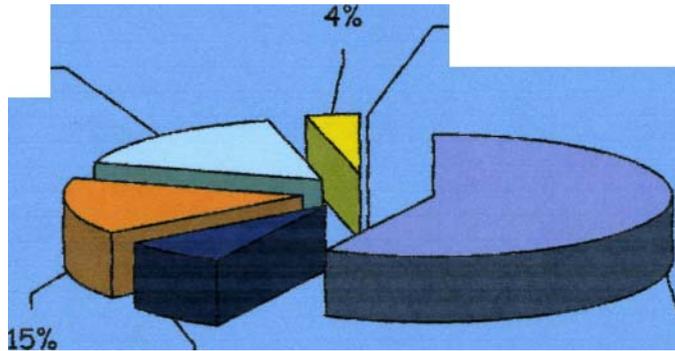
Mammella Destra



Indaco = Qse
Blù = Qie
Arancione = Qsi
Azzurro = Qii
Nero = Centrale
Giallo = Diffuso

Grafico n° 9 A Distribuzione nelle neoplasie a carico della mammella destra nel gruppo A espresse in valori percentuali

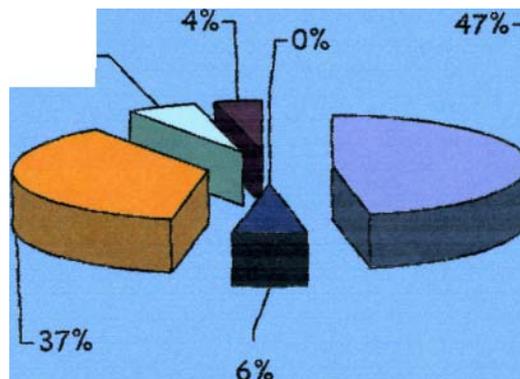
Mammella Sinistra



Indaco = Qse 57%
 Blù = Qie 7%
 Arancione = Qsi 15%
 Azzurro = Qii 17%
 Giallo = Centrale 4%
 Rosa = Diffuso 0%

Grafico n° 9 B Distribuzione nelle neoplasie a carico della mammella sinistra nel gruppo A espresse in valori percentuali

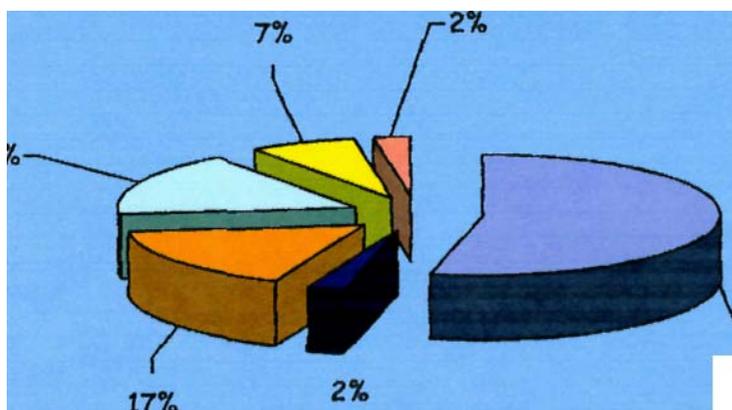
Mammella Destra



Indaco = Qse 47%
 Blù = Qie 6%
 Arancione = Qsi 37%
 Azzurro = Qii 6%
 Nero = Centrale 4%
 Giallo = Diffuso 0%

GRAFICO N° 10 A : Distribuzione delle neoplasie a carico della mammella destra nel Gruppo B espresse in valori percentuali

Mammella Sinistra



55 %

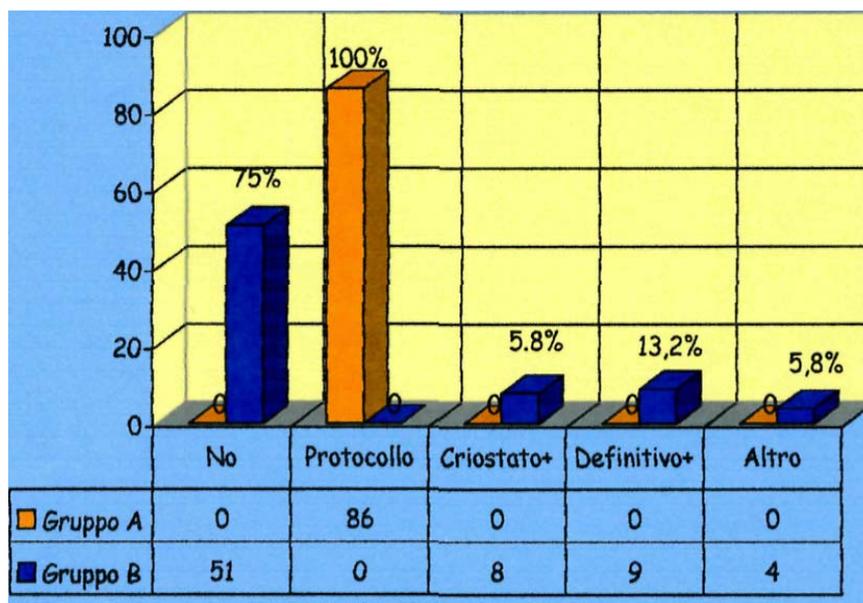
Indaco = Qse 55%
 Blù = Qie 2%
 Arancione =Qsi 17%
 Azzurro =Qli 17%
 Giallo = Centrale 7%
 Rosa = Diffuso 2%

Grafico N° 10 B: Distribuzione delle neoplasie a carico della mammella sinistra nel Gruppo B espresse in valori percentuali

In entrambi i gruppi è presente una netta prevalenza delle localizzazioni al Quadrante Supero Esterno, seguito dal Quadrante Supero Interno senza una significativa differenza tra i due lati (Gruppo A: 14 a destra 31 a sinistra; Gruppo B: 24 a destra e 22 a sinistra)

Lo SVUOTAMENTO ASCELLARE è stato effettuato per protocollo in tutte le 86 pazienti del Gruppo A. Nel gruppo B è stato invece effettuato soltanto in alcuni casi, come evidenziato nel Grafico 11.

Svuotamento Ascellare



Arancione = Gruppo A Blù = Gruppo B

Grafico N° 11 Svuotamenti Ascellari eseguiti espressi in valore assoluto (I valori percentuali sono indicati nei rispettivi istogrammi)

Nel complesso solo 17 su 86 pazienti del Gruppo B, pari al 19,76%, si è proceduto a dissezione ascellare già nel corso del primo intervento o in un successivo atto operatorio. Oltre ai casi con positività del Linfonodo Sentinella si è proceduto a dissezione ascellare in altre 4 pazienti o per mancato reperimento del Linfonodo Sentinella (1 caso) o per presenza all'esame definitivo di una malattia multicentrica (3 casi) in cui la metodica in oggetto è per definizione non applicabile. Come già detto una paziente con Linfonodo Sentinella micrometastatico ha rifiutato la dissezione ascellare.

LE COMPLICAZIONI DEGLI SVUOTAMENTI ASCELLARI sono rappresentate nella Tabella 5 e sono espressi sia in valore assoluto che percentuale.

	NESSUNA	LINFOCELE	INFEZIONE	ALTRO
Gruppo A	44(51,1%)	30 (34,8%)	2(2,3%)	4(4,6%)
Gruppo B	15(71,4%)	5(23,8%)	0	1(4,7)

Tabella 5

Non è chiaro perché nelle pazienti del gruppo B ci sia una minor incidenza di complicazioni dello svuotamento, specie dei linfoceli (-11%). E' possibile che l'esiguità del campione renda non attendibile il dato.

IL NUMERO DI LINFONODI ASPORTATI nei due gruppi, che per certi aspetti indica l'estensione dello svuotamento, non è infatti diverso:

Gruppo A; media 20,60 (range 9 -44)

Gruppo B: media 20,72 (range 8 - 38).

Per quanto riguarda le caratteristiche anatomo-patologiche delle neoplasie asportate i risultati sono i seguenti:

DIAMETRO MEDIO DEL T:

Gruppo A: media 15,30 (range 4 - 38)

Gruppo B: media 13,51 (range 1 - 30)

TIPO ISTOLOGICO

La distribuzione dei vari tipi istologici è rappresentata nel grafico N.° 12.

Una leggera prevalenza delle varianti Duttali è documentabile nel Gruppo A, ma ciò non ha rilevanza statistica.

I rimanenti istotipi sono invece rappresentati in modo pressoché sovrapponibile.

Istotipo

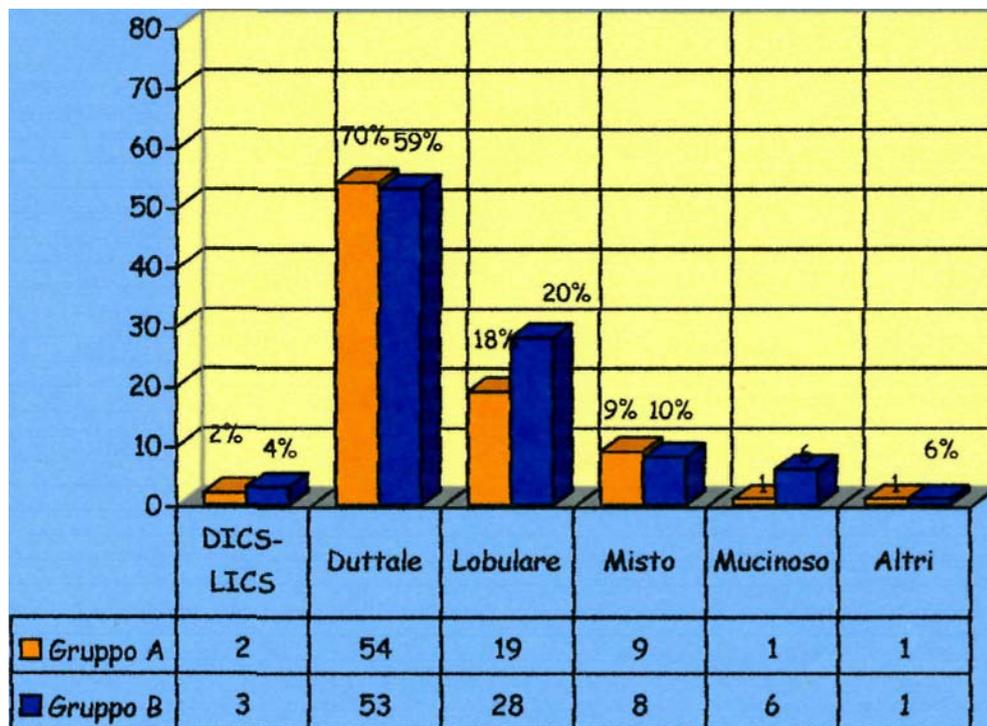


Grafico N°12 Distribuzione dei vari tipi istologici nei due gruppi in valori assoluti (I valori percentuali sono indicati nei rispettivi istogrammi)

Oltre alla distribuzione dei vari tipi istologici sono stati valutati altri fattori prognostici e cioè:

- La presenza di invasione vascolare e linfatica (Tabella 6)
-

	NON VALUTATA	ASSENTE	PRESENTE
Gruppo A	1 (1,16%)	59 (68,60%)	26 (30,23%)
Gruppo B	4 (4,04%)	77 (77,77%)	18 (18,18%)

Tabella 6 - Invasione vascolare

Come si evidenzia in valori percentuali non esiste una significativa differenza tra i due gruppi. E' da segnalare solo una lieve maggior incidenza di estensione ai vasi nel Gruppo A.

> La estensione della componente intraduttale (Tabella 7)

	ASSENTE	< 25%	> 25%
Gruppo A	70 (81,39%)	8 (9,30%)	8 (9,30%)
Gruppo B	59 (59,59%)	24 (24,24%)	15 (15,15%)

Tabella 7 - Componente intraduttale.

I dati riportati nelle soprastante tabella dimostrano una diversa distribuzione della "Componente Intraduttale" nei due gruppi.

Lo stato dei margini (Grafico 13)

Stato dei Margini

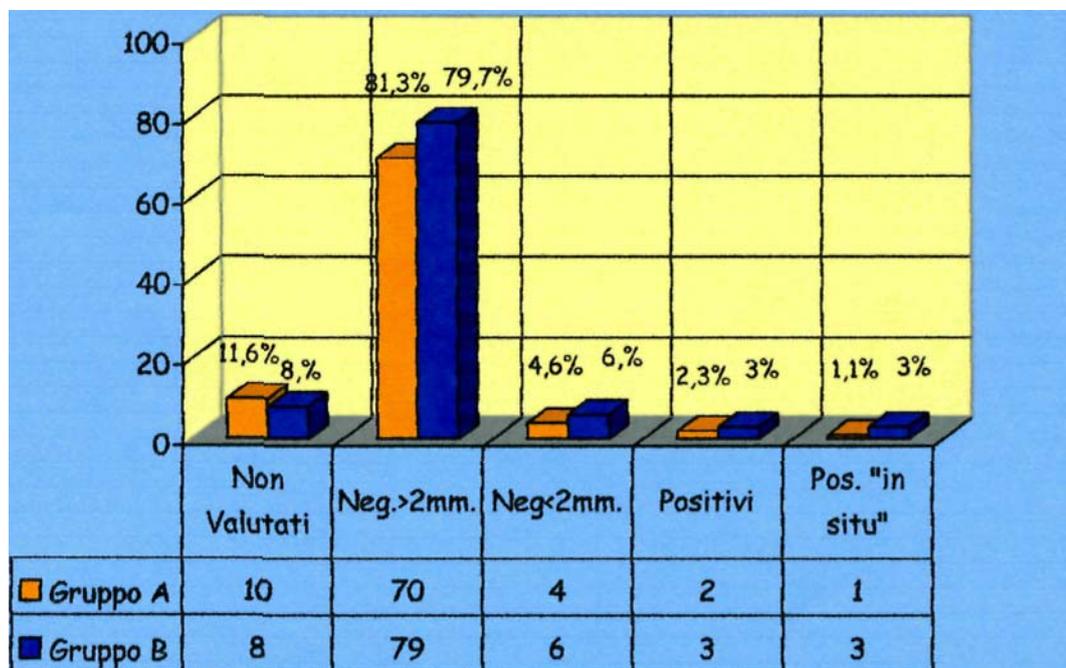


Grafico N°13 Stato dei margini in valori assoluti (Sugli istogrammi sono indicate le rispettive percentuali)

Anche per quanto riguarda questo parametro non ci sono differenze significative tra i due gruppi. Sia nel gruppo A che ne! B le pazienti in cui non è stata effettuata una valutazione dei margini erano state sottoposte a chirurgia demolitiva.

> I recettori ormonali (Grafico 14)

Lo stato di espressione dei Recettori Ormonali è indicato nel sottostante Grafico 13. I valori sono sostanzialmente sovrapponibili.

Recettori Ormonali

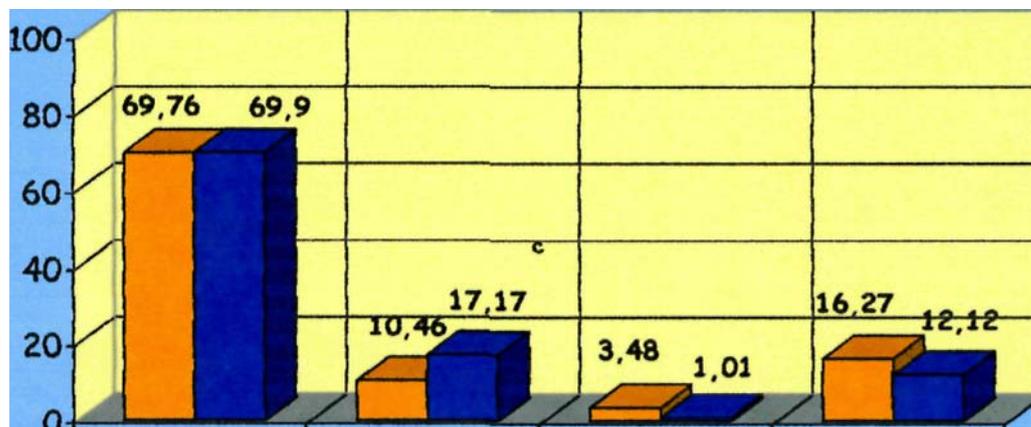


Grafico 14 : Espressione dei Recettori Ormonali in valori percentuali.

Ultimo parametro preso in considerazione è rappresentata dalla **concordanza tra il Linfonodo Sentinella ed i rimanenti linfonodi** nel caso in cui si sia effettuato lo svuotamento ascellare. Questa analisi è fattibile in maniera completa solo nel gruppo di controllo mentre nel Gruppo B, di necessità, il dato è disponibile solo per le pazienti che hanno per una qualche ragione subito lo svuotamento.

	NON VALUTATO	L. S. NEGATIVO ALTRI LNF NEG.	L.S. NEGATIVO ALTRI LNF POS.	SOLO L.S. POSITIVO	L.S. POSITIVO ALTRI LNF POS.
Gruppo A	3 (3,4%)	57 (62,2%)	5 (5,8%)	15 (17,4%)	6 (6,9%)
Gruppo B	77 (77,7%)	2 (2,1%)	1 (1%)	16 (16,1%)	2 (2,1%)

Tabella 8 Concordanza linfonodale

Come si vede in entrambi i gruppi si sono verificati dei falsi negativi.

Nei tre casi del Gruppo A uno è rappresentato dalla prima paziente randomizzata che aveva una malattia multi focale e che pertanto dovrebbe essere esclusa mentre gli altri quattro sono dei veri "falsi negativi". In tal modo la percentuale di falsi negativi scenderebbe al 4,6%.

Nel Gruppo B invece è stato individuato un vero falso negativo. Si tratta di una paziente con neoplasia molto periferica e con linfonodo sentinella molto vicino alla sede dell'inoculo e pertanto nascosto dalla emissione radioattiva di quest'ultimo ed individuato solo all'esame del quadrante asportato.

Nel complesso le pazienti con linfonodi metastatici in ascella erano:

30,2% nel Gruppo A

19,1% nel Gruppo B

La leggera prevalenza di metastasi ascellari documentate nel Gruppo A, assieme alla più elevata percentuale di falsi negativi fa presumere che una piccola percentuale di Pazienti del Gruppo B siano state sottostadiate. Come già dimostrato in precedenza la maggioranza delle pazienti con metastasi ascellari presentava tuttavia delle "micrometastasi" il cui impatto sulla sopravvivenza non è a tutt'oggi conosciuto. Solo con i controlli a distanza si potrà valutare se questa possibile sottostadiazione abbia o meno un significato clinico in termini di riduzione

dell'intervallo libero da malattia ed eventualmente della sopravvivenza. Questo va comunque oltre gli scopi di questo studio.

CONCLUSIONI

Allo stato attuale si può soltanto affermare che la percentuale di identificazione del Linfonodo Sentinella è stata:

Gruppo A = 98,1%

Gruppo B = 98,5%

Questi valori sono corrispondenti a quelli riportati in letteratura, mentre la concordanza linfonodale, calcolata nel gruppo A, è stata complessivamente del 93,95%, al di sotto dei risultati riportati in letteratura. E' verosimile tuttavia che una miglior selezione delle pazienti possa ridurre ulteriormente la percentuale di falsi negativi, rendendo la metodica del Linfonodo Sentinella una valida alternativa la dissezione ascellare di principio.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 973/06/00

Responsabile Scientifico Figoli Franco - Ente Proponente ULSS 5 di Arzignano

“Qualità nell'assistenza: dalla programmazione alla gestione e alla verifica. Progetto di qualità assistenziale per un progetto sulla persona (malato/operatore) e sulle strutture/risorse. Dall'esperienza delle problematiche emerse nella gestione del paziente oncologico uno studio per l'accreditamento di un modello organizzativo di Home Care come processo di verifica e miglioramento dei servizi erogati per una Evidence Based Medicine”.

L'UOA di Oncologia Medica dell'ULSS 5 “Ovest Vicentino” è nata nel gennaio 1996 inizialmente con la sola attività di day hospital a cui si è aggiunto l'anno successivo, il reparto di degenza. Oggi l'attività si svolge con un day hospital funzionante su due ospedali (Montecchio Maggiore e Valdagno), una collaborazione con i Distretti per l'assistenza domiciliare ed una attività di consulenza per i malati oncologici ricoverati presso i vari ospedali dell' U.L.S.S. 5. L'attività così sfaccettata e ricca di contatti con operatori di varia provenienza, la complessità della patologia e la tipologia del malato stesso hanno subito reso evidente la necessità di definire un percorso il più chiaro e semplice possibile sia per gli operatori dell' U.O.A. di Oncologia e di altre U.O.A. che per il malato e i familiari. E' nata così l'idea del manuale, ossia una sorta di raccolta di tutte le procedure e di tutti i percorsi che vengono utilizzati e seguiti da operatori e malati all'interno dell' U.O.A. di Oncologia. La descrizione delle manovre anche più semplici e dei percorsi che gli operatori e i malati seguono quotidianamente ha solo lo scopo di avere (tramite la definizione del **chi, cosa, come, quando, perché, dove, con chi**) tutti un comportamento omogeneo con l'obiettivo di migliorare la qualità del servizio offerto e la qualità di vita del malato e degli operatori stessi evitando contrattempi e sprechi di tempo. Un percorso dunque che ha avuto come parola d'ordine la qualità intesa come efficienza del servizio erogato e qualità di vita del malato e degli operatori. Da qui quindi, la necessità di vedere valorizzato e codificato secondo regole ben precise, il proprio lavoro. Nasce così l'idea di lavorare per l'accreditamento ossia per il riconoscimento che l'operato all'interno dell' U.O.A. di Oncologia Medica corrisponde ai criteri di eccellenza.

In pratica il percorso da noi seguito è stato il seguente:

1. Realizzazione di una attività dipartimentale oncologica comprendente il territorio che prevede una organizzazione fondata sulla integrazione di tutte le figure professionali coinvolte nella gestione del malato oncologico candidato a cure palliative;
2. Costituzione di un gruppo di lavoro integrato comprendente operatori dell'U.O.A. di Oncologia Medica e dei Distretti Sanitari, Medici di Medicina Generale ed Assistenti Sociali dei comuni interessati;
3. Realizzazione di seminari settimanali atti a sviluppare un programma formativo per il gruppo di lavoro centrato su:
 - Filosofia del progetto;
 - Necessità e bisogni del malato sia a livello ospedaliero che territoriale;
 - Individuazione e gestione di problemi non sanitari che possono influenzare la gestione complessiva del malato oncologico;
 - Implicazioni psicologiche legate all'adattamento alla malattia;
 - Comunicazione medico-malato e/o familiare;
 - Risposte ai possibili bisogni del malato;
 - Supporto sociale e psicologico;
4. Attivazione di un servizio di assistenza a domicilio per i malati dimessi da reparti di degenza ospedaliera e candidati a cure palliative domiciliari;

5. Realizzazione di riunioni settimanali per tutti gli operatori coinvolti nella gestione del malato oncologico a domicilio allo scopo di affrontare le problematiche gestionali di ogni singolo caso e definire le decisioni operative più opportune;
6. Realizzazione nell'ambito di ogni Distretto, di riunioni con i Medici di Medicina Generale con l'obiettivo di stilare un protocollo per l'assistenza domiciliare integrata dei malati oncologici;
7. Elaborazione e sperimentazione di schede per la gestione del malato oncologico seguito in regime di assistenza domiciliare integrata.

L'obiettivo finale è ovviamente, quello di creare una "rete" attorno al malato oncologico candidato a cure palliative al fine di:

1. Evitare o perlomeno, ridurre i ricoveri ospedalieri impropri;
2. Evitare la sensazione di solitudine e talvolta, di abbandono da parte del malato e dei familiari migliorandone la qualità di vita;
3. Garantire una gestione programmata dei bisogni e degli interventi.

La verifica costante delle attività integrate del gruppo di lavoro ci ha permesso di ottenere:

1. migliore gestione del malato oncologico a domicilio;
2. buon grado di soddisfazione dei familiari con loro migliore capacità di gestione domiciliare del malato;
3. attenuazione del sentimento di solitudine e abbandono da parte sia del malato che dei familiari;
4. riduzione considerevole del numero di ricoveri e dei periodi di degenza ospedaliera;
5. riduzione del numero di complicanze per una maggior capacità di prevederle e quindi, prevenirle;
6. miglioramento e rafforzamento delle capacità comunicative tra gli operatori;
7. crescita personale e professionale degli operatori

Non va inoltre, dimenticato che ad oggi:

1. oltre il 50% dei malati oncologici seguiti in regime di assistenza domiciliare è deceduta al proprio domicilio;
2. il 50% circa dei malati oncologici assistiti in regime di assistenza domiciliare e deceduto in regime di ricovero ospedaliero, ha avuto una degenza di durata comunque inferiore ai sette giorni.

Tutto questo dimostra che con una buona organizzazione è possibile raggiungere un buon sinergismo tra ospedale e territorio con l'obiettivo di ottimizzare la gestione del malato oncologico candidato a cure palliative.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 975/06/00

Responsabile Scientifico Forza Giovanni - Ente Proponente ULSS 16 di Padova

“Integrazione degli interventi per smettere di fumare”.

Gli interventi per la cessazione dal fumo conseguono nelle esperienze analizzate della nostra Regione buoni risultati, in linea con quelli riportati nella letteratura internazionale.

a) interventi dei MMG per la cessazione dal fumo (Padova).

I MMG dell'ULSS 16 che hanno partecipato al progetto fornendo i dati sui pazienti fumatori assistiti sono stati 41: il bacino di utenza interessato è di 50397 assistiti. Di questi 22808 (45.3%) sono stati rilevati per lo stato di fumatore, e sono risultati fumatori attivi 3198 (pari al 14.0 % della popolazione rilevata). I fumatori attivi sono stati classificati in base alla loro motivazione alla cessazione come precontemplativi o "irriducibili" (1549, 51.0%), contemplativi o "indecisi"/determinati (1489, 49%). Su tutti questi fumatori è stato attuato un intervento, che era prevalentemente un suggerimento a smettere di fumare per gli "irriducibili" ed un counselling più o meno supportato con farmaci per gli "indecisi" o determinati. E' stato selezionato casualmente un campione di 645 pazienti fumatori, ricontattato ad un anno di distanza: di questi 117 erano ancora astinenti (18.1%). L'analisi di regressione logistica individua solo due variabili predittive per il rischio di continuare a fumare: il livello di determinazione e la terapia farmacologica.

I soggetti "irriducibili" hanno una probabilità di continuare a fumare di quasi tre volte superiore rispetto ai soggetti con un diverso livello di determinazione, mentre l'utilizzo dei farmaci è un fattore protettivo e comporta una riduzione del rischio di continuare a fumare pari al 46%.

b) interventi specialistici per la cessazione dal fumo (Treviso)

La parte dello studio svolta nell'ambulatorio specialistico di Treviso conferma la validità di tali servizi, che portano il risultato ad un anno ai livelli massimi registrati in letteratura (cessazione ad un anno intorno al 35%); si deve rilevare che in tali ambiti non sembrano emergere variabili predittive particolari di successo, se non proprio il fatto che l'utente si rivolga a tali servizi. Al contrario della popolazione non selezionata vista dai Medici di Famiglia di Padova, ci troviamo infatti davanti a persone che hanno richiesto attivamente un trattamento (anche se l'intenzione espressa dall'utente all'operatore del servizio specialistico può apparire ambivalente).

Si deve peraltro rilevare che, rispetto allo studio di PD, interventi di maggiore intensità sembrano ottenere maggiore beneficio (guadagno relativo) nelle persone con minore motivazione, che d'altra parte sono proprio quelle che ricercano meno l'intervento del II livello e possono essere più spesso viste dal MMG.

c) valutazione dei tempi di intervento nella pratica ambulatoriale dei MMG (Camponogara)

Nell'ambito dell'ULSS 13 (Mirano VE), sono stati formati alla cessazione al fumo 48 MMG, di cui 17 hanno fornito dati relativi al volume di attività.

I 17 medici hanno lavorato per il progetto complessivamente 290 mesi-uomo (in media 17 mesi a testa); il loro bacino di utenza era di 20477 assistiti.

Sono stati rilevati 642 fumatori, su cui si sono attuati 613 interventi di counselling breve (10' di lavoro stimato ad intervento), 158 interventi di counselling intensivo (30' di lavoro stimato ad intervento) e 123 interventi di follow-up (10' di lavoro stimato ad intervento).

Nel complesso il lavoro stimato svolto dai 17 medici per attività rivolte alla cessazione dal fumo è stato di 201 h 40', cioè poco più di 40' al mese per medico e poco meno di 20' per paziente trattato.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Il risultato conseguito con il lavoro dei Medici di Famiglia di Padova consegue risultati superiori a quelli riportati nelle revisioni Cochrane di letteratura. Il dato è certamente ascrivibile al notevole investimento del Gruppo Collaborativo di Padova, che ha coinvolto ULSS e Medici di Famiglia nella fase di programmazione dell'intervento, definizione delle linee guida, formazione dei Medici di Famiglia, supervisione per l'anno di attuazione del lavoro svolto; non è secondario rilevare che il lavoro svolto dai MMG è stato inserito fra i progetti incentivati dall'ULSS.

L'efficacia dell'intervento dei Medici di Famiglia è particolarmente rilevante se si considera che, nel loro lavoro quotidiano, questi vengono a contatto con una fetta vastissima della popolazione generale fra cui fumatori "precontemplativi" altrimenti difficilmente raggiungibili da altre sollecitazioni del Sistema Sanitario: anche fra questi fumatori si rilevano percentuali di successo ad un anno significative, con completa cessazione in un soggetto su dieci e comunque un'azione capillare di sensibilizzazione potenzialmente ripetibile nel tempo. Un suggerimento che scaturisce necessariamente da questa ricerca è di estendere e dare continuità al lavoro dei Medici di Famiglia, evitando che iniziative come quella qui esaminata siano puntiformi e sporadiche sia nel tempo sia nello spazio.

Nella popolazione generale le variabili che maggiormente incidono sulla cessazione dal fumo sono lo stato della motivazione e la proposizione di interventi di maggiore intensità del semplice suggerimento di smettere, come ad esempio un counselling motivazionale breve (15 minuti, ripetuti nel tempo) con il sostegno di sostitutivi o bupropione.

Interventi di maggiore intensità sembrano ottenere maggiore beneficio (guadagno relativo) nelle persone con minore motivazione, che d'altra parte sono proprio quelle che ricercano meno l'intervento del II livello e possono essere più spesso viste dal MMG. Questo paradosso può essere superato attraverso l'integrazione del lavoro fra MMG e centro di II livello, dove il MMG dovrebbe tentare di inviare precontemplativi (e contemplativi con maggiore intensità di dipendenza); d'altra parte appare di maggiore economicità la gestione da parte del MMG dei soggetti determinati ed, almeno in prima battuta, dei soggetti contemplativi, in particolare se con intensità di dipendenza medio-bassa.

Questo è affine a quanto già avviene quando il MMG invia ad una visita specialistica i pazienti di maggiore complessità, riservandosi la gestione diretta dei casi di minore impegno (ad es. diabete, cardiopatie...). Si chiede quindi di considerare l'intervento sul fumo nei pazienti meno motivati come un intervento specialistico. D'altra parte l'invio di pazienti più motivati al MMG libera le risorse per un'azione maggiormente incisiva dei centri di II livello sui pazienti meno motivati. A fronte di tale constatazione si deve invece rilevare dai dati della ricerca una quantità minima di invio da MMG ai centri di II livello ed un nullo reinvio da questi ai MMG.

Si tratta quindi di operare delle azioni per un maggiore raccordo fra le azioni di I e di II livello, in modo da ottimizzare, anche in termini di efficienza, il ruolo differente che gli operatori sanitari possono svolgere nei differenti contesti. Risultano al riguardo preziose le iniziative di formazione congiunta fra operatori ULSS e MMG svolte a Padova e Camponogara, ma esse devono approfondire gli aspetti anche delle diverse fasce di utenza viste e della necessità di concentrare le proprie azioni su quelle che possono ricavare il massimo beneficio al rispettivo livello di azione. Dal punto di vista dei costi, salvo un investimento iniziale per la formazione al counselling per la cessazione dal fumo, l'intervento del Medico di Famiglia appare comunque di facile esecuzione, limitato nel tempo (circa 40' al mese) e di estrema efficacia.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 977/06/00

Responsabile Scientifico Gattinoni Francesca - Ente Proponente ULSS 7 di Pieve di Soligo

“Valutazione di efficacia e costo/benefici di una gestione della lombalgia da parte del medico di medicina generale attraverso l'adozione di alcuni semplici indirizzi terapeutici e una ridefinizione di ruolo per la medicina specialistica”.

Si prevedeva di valutare in termini di salute e di utilizzo di risorse gli effetti di diversi approcci alla lombalgia, al fine di arrivare ad un uso migliore delle risorse stesse anche tramite il loro trasferimento da un livello specialistico di secondo livello a quello della medicina di base, passando contestualmente da un approccio passivo da parte del paziente ad uno attivo.

All'interno di questa seconda possibilità, era prevista una valutazione dell'efficacia e del costo dell'intervento del solo medico di base anche tramite il libretto divulgativo, oppure tramite il libretto divulgativo e la Back School tenuta dai fisioterapisti del servizio ospedaliero ma il cui accesso fosse gestito dai medici di medicina generale stessi.

Popolazione arruolata: sono stati arruolati 140 pazienti (78 maschi e 62 femmine).

La categoria lavorativa più rappresentata è stata quella degli operai (55.9%), seguita dagli impiegati (11.8%) e dalle casalinghe (11%).

Frequenza per età: le persone affette da lombalgia che ricorrono al medico sono prevalentemente giovani adulti di 32-46 anni, come in letteratura.

Nella nostra rilevazione erano esclusi i maggiori di 60 anni ed i minori di 18.

Fattori di rischio: sono rappresentati prevalentemente dai fattori meccanici, concordemente con la bibliografia; i fattori psicosociali possono invece aggravare una lombalgia cronica e vanno ricercati in tale evenienza.

VALUTAZIONE A UN MESE

Condizioni dei pazienti ad un mese dalla visita

Sono state confrontate le condizioni cliniche dei pazienti del gruppo LG ("Linee guida") con i pazienti del gruppo BS ("Linee guida + Back school") con un semplice indicatore di salute:

guarito/migliorato/invariato/peggiorato.

In tutto erano migliorati 32 pazienti (39.51%) e guariti 31 pazienti (38.3%) sul totale di 81. Nessuno era peggiorato, invariati erano 18 pazienti (22.2%).

Sia per quanto riguarda il parametro "miglioramento" che per la "guarigione" la percentuale era più elevata in maniera molto significativa per il gruppo LG (vedi tabelle 3 e 4: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

Poiché il gruppo di controllo non prevedeva la registrazione della visita ad un mese, i dati si riferiscono solo ai gruppi BS e LG.

L'analisi dei costi a un mese (vedi tabella 5: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale)

A un mese dalla visita sono stati evidenziati i seguenti dati:

- una prescrizione di farmaci (in giorni farmaci) significativamente inferiore per il gruppo LG sia rispetto al gruppo BS che a quello di controllo;
- una prescrizione di esami inferiori sia per il gruppo LG che per quello BS rispetto ai controlli;

- un maggior numero di ricorsi al medico di medicina generale per il gruppo BS rispetto ai controlli (e non per il gruppo LG);
- un maggior numero di giorni di riposo dal lavoro per il gruppo BS (e non per il gruppo LG);
- per nessun paziente è stato necessario il ricovero ospedaliero.

VALUTAZIONE A DUE ANNI

Indicatori di salute

A distanza di due anni gli indicatori sono stati rilevati direttamente dai ricercatori attraverso un'intervista telefonica.

Per lo stato di salute dei pazienti sono stati utilizzati i seguenti indicatori:

- numero delle ricadute di lombalgia acuta
- presenza di almeno trenta giorni di fastidio e/o dolore all'anno
- numero delle cronicizzazioni (fastidio e dolore ogni giorno per almeno sei mesi)

Tali indicatori hanno evidenziato (vedi tabelle n. 6 e 7: agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale):

- una variazione non significativa di ricadute nei tre gruppi;
- una variazione non significativa nella presenza di fastidio e/o dolore nei tre gruppi;
- un minor numero di cronicizzazioni per i gruppi BS e LG, in maniera statisticamente significativa solo per il gruppo BS.

Analisi dei costi a due anni

Abbiamo utilizzato i seguenti parametri:

- uso abituale di farmaci (almeno una volta al mese negli ultimi sei mesi);
- ricorso a esami e a visite specialistiche,
- numero di giornate di lavoro perse nell'ultimo anno.

L'analisi dei dati rilevati evidenzia:

- un minor ricorso ai farmaci per il gruppo LG rispetto ai controlli, mentre è invariato per il gruppo BS;
- non vi sono variazioni statisticamente significative per il ricorso ad esami;
- un minor ricorso statisticamente significativo alle visite specialistiche del gruppo LG rispetto ai controlli, mentre per il gruppo BS vi è una diminuzione non significativa;
- un minor numero di giornate di lavoro perse statisticamente significativo per il gruppo LG giornate di lavoro perse.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

- Il primo dato interessante che si evidenzia è la maggior percentuale di miglioramenti e guarigioni al primo mese dopo la diagnosi per i pazienti che facevano parte del gruppo LG rispetto al gruppo BS. Tale dato rapportato alla prescrizione più contenuta di terapia farmacologica, di esami e di giorni di assenza dal lavoro - sia rispetto ai controlli che al gruppo BS - indicherebbe una maggior efficacia associata ad una maggiore efficienza dell'approccio che prevede la gestione del mal di schiena da parte del solo medico di medicina generale. Nel caso del gruppo che aveva la possibilità di inviare il paziente alla Back School al contrario non sarebbe stato rinforzato e supportato sufficientemente il messaggio all'atto della prima visita: poiché le linee guida partono proprio dal presupposto che ciò che viene dato al paziente in prima battuta è già terapeutico di per sé, sarebbe qui venuto a mancare proprio l'intervento terapeutico di primo livello, delegandolo ad un secondo momento.
- L'analisi delle condizioni a due anni dimostra una sostanziale parità tra i pazienti dei tre gruppi sia per quanto riguarda il numero di ricadute che per i giorni di fastidio e/o dolore, il che suggerirebbe una scarsa incisività degli approcci proposti sull'evoluzione naturale di questi aspetti a lungo termine.
- I casi di cronicizzazione invece sono significativamente inferiori nel gruppo BS che negli altri due gruppi, indicando l'efficacia in tal senso della BS.
- Per contro, le assenze dal lavoro sono state superiori in maniera molto significativa nel gruppo BS rispetto agli altri. Questo dato conferma ed enfatizza i risultati già ottenuti alla fine del primo mese e indica quanto il primo approccio al mal di schiena abbia poi conseguenze durature nel tempo per quanto riguarda l'atteggiamento del paziente, le abitudini dannose e la disabilità che ne deriva. Alla prima visita per mal di schiena avverrebbe, per così dire, una sorta di imprinting che condiziona poi nel tempo i comportamenti

dei pazienti nei confronti sia della lombalgia che della disabilità che ne deriva e del proprio atteggiamento rispetto all'attività fisica e lavorativa.

- L'apparente contrasto tra la diminuzione della cronicizzazione e l'aumento delle giornate lavorative perse è poi molto interessante perché evidenzia come l'efficacia in termini di salute non corrisponda necessariamente ad una efficacia in termini di disabilità e di costi sociali, e ci dà delle importanti indicazioni per una più corretta gestione della lombalgia anche in questa prospettiva.
- Per quanto riguarda l'analisi dei costi, il gruppo LG evidenzia invece un minor numero di giornate lavorative perse sia rispetto al gruppo BS che a quello dei controlli, confermando quindi l'analisi sull'importanza dei contenuti del primo approccio alla lombalgia del medico generale. Di pari passo vanno a nostro parere il minor ricorso ai farmaci e alle visite specialistiche di questo gruppo rispetto agli altri.

In conclusione possiamo affermare che l'approccio del gruppo LG determina una più precoce guarigione in occasione dell'episodio acuto mentre non risulta efficace nel diminuire il numero di ricadute e il numero delle giornate con dolore e/o fastidio lombare a distanza di tempo.

Per contro tale approccio sembra avere costi più contenuti sia in occasione dell'episodio acuto che nel tempo e, soprattutto, sembra determinare un minor numero di giornate lavorative perse e quindi una minor disabilità e un minor costo sociale.

La Back School non si è dimostrata invece utile in una gestione di primo livello della lombalgia, verosimilmente perché contrasta con la presa in carico completa del problema da parte del medico e con la messa in atto di tutti gli interventi terapeutici previsti nella gestione primaria della lombalgia: ciò annulla o diminuisce il positivo impatto che l'intervento del medico di base ha sul comportamento del paziente, e induce invece un atteggiamento passivo e di attesa.

Sembra invece di poter raccomandare la Back School quando, dopo una corretta gestione primaria della lombalgia secondo le citate linee guida, il paziente tenda a non guarire e rischi quindi una cronicizzazione del dolore e della disabilità conseguente.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Il nostro lavoro rappresenta la prima esperienza in Italia di applicazione di un percorso assistenziale per pazienti lombalgici afferenti alla medicina di base, tramite il coinvolgimento e la sinergia di un gruppo di medici di medicina generale e di una unità operativa ospedaliera specialistica di riabilitazione. Tale lavoro ha avuto come obiettivo il trasferimento di competenze e di risorse dalla medicina specialistica a quella di base in accordo con le linee guida nazionali e internazionali sull'argomento. Parallelamente è stata formulata la presente ricerca con la finalità di dimostrare l'efficacia e l'efficienza dei sistemi proposti.

Possiamo affermare che l'obiettivo della ricerca è stato sostanzialmente raggiunto avendo dimostrato la maggiore efficacia e l'efficienza di un percorso che prevede una gestione primaria da parte della medicina di base, che riserva un intervento specialistico solo ai casi più gravi e/o complicati e che riserva un eventuale intervento di Back School solo ai casi che tendano a cronicizzare.

In ogni caso per mettere in pratica tale percorso è indispensabile una adeguata preparazione dei medici di medicina generale tramite dei corsi di formazione appositi da organizzarsi da parte della regione o degli ordini dei Medici o delle USL stesse.

Le ricadute per il sistema sanitario nazionale sarebbero una "decompressione" sui servizi specialistici (in particolare di riabilitazione e di radiologia) accompagnata da un più precoce recupero in occasione dell'episodio acuto e da un minor numero di giornate lavorative perse senza sostanziali modifiche degli indici di salute nel lungo periodo.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 978/02/00

Responsabile Scientifico Griso Claudia - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Verona

“Protocollo di chemio-radioterapia neoadiuvante per l'adenocarcinoma del cardias. Studio di fase II”.

Dal gennaio 2000 al Giugno 2003 sono stati arruolati 40 pazienti con carcinoma della giunzione gastroesofagea e dell'esofago distale (10 carcinomi squamosi e 30 adenocarcinomi). L'età mediana era di 61,5 anni (range 47-76); 32 erano maschi. I pazienti venivano sottoposti a chemioterapia (5-Fluorouracile, Cisplatino, Taxotere) e radioterapia concomitante.

In seguito all'ottima tolleranza della terapia programmata di Chemio e Radioterapia da parte dei primi pazienti trattati, è stata decisa "l'intensificazione" del trattamento, con lo scopo di definire la DMT.

La dose è stata incrementata secondo le classiche triplete: se non si verificava alcuna tossicità di grado 3-4 si passava allo step successivo, altrimenti venivano introdotti altri tre pazienti. Se si verificava una tossicità di grado 3-4 in uno di questi pazienti la dose massima tollerabile era considerata quella del livello precedente.

Step 1: D (Docetaxel) e P (Cisplatino) gg. 1, 8, 15 e 5-FU (5-Fluorouracile) 150 mg/m² p.c.i. gg. 1-21. Dopo una settimana di intervallo lo stesso ciclo (gg. 29-49) veniva ripetuto in associazione alla Radioterapia (40 Gy).

Step 2: La dose di D e di P erano aumentate a 25 mg/m² e 5 FU a 180 mg/m² per i primi 21 giorni.

Step 3: 5 FU veniva prolungato di una settimana durante la Radioterapia (150 mg/m² gg. 29-56).

Step 4: D e P 25 mg/m² erano somministrati anche il giorno 50.

Step 5: La dose di Radioterapia era aumentata a 50 Gy. Step 6: La dose di D era aumentata a 30 mg/m².

Step 7: La dose di D era aumentata a 35 mg/m².

L'intervento chirurgico veniva eseguito da 4 a 6 settimane dopo la fine della Radioterapia. Sono stati somministrati 264 cicli, 120 nella prima fase di sola chemioterapia e 144 nella fase di chemioterapia associata alla radioterapia. Quasi tutti i cicli sono stati somministrati in regime ambulatoriale. La tossicità ematologica si è verificata in 29 dei 264 cicli.

Nel primo step una paziente ha avuto una tossicità di grado 4 (ematologica e mucosite); sono stati pertanto inseriti altri 3 pazienti senza che si riscontrasse ulteriore tossicità. Durante la fase di terapia combinata (CT/RT) vi è stata tossicità ematologica in 28 dei 144 cicli: di grado 1-2 in 25 dei 28 casi, grado 3 in due casi, e solo 1 ciclo è stato complicato da una tossicità di grado 4.

La tossicità non ematologica (quasi esclusivamente gastrointestinale e durante la fase di terapia combinata) è stata di grado 1 in 15 pazienti, grado 2 in nove e grado 3 in 1 paz. Globalmente la tossicità ematologica e non ematologica ha interessato il 39,5% dei cicli nei livelli 1-5 e il 73,5% nei livelli 6-7.

Negli steps 1-5 l'87% delle tossicità era di grado 1 e il 13% di grado 2. Negli steps 6-7 il 64,5% era di grado 1, il 32,5% di grado 2 e il 3% di grado 3. Negli steps 3 e 7, 2 pazienti hanno richiesto il ricovero in ospedale per astenia ed esofagite di grado 3.

Sono valutabili 37 pazienti, che hanno completato il trattamento di chemio-radioterapico neoadiuvante e la chirurgia. Non vi è stato un aumento della morbilità e della mortalità peri e post-operatorie.

E' stato osservato un downstaging nel 73% dei casi (27/37), 19 pazienti non hanno risposto alla terapia (7/37) e l'8% ha avuto malattia stazionaria (3/37). La completa scomparsa all'esame istologico del tumore primitivo (pTO) è stato riscontrato in 11 pazienti e microfoci tumorali residui sono stati individuati in 10 pazienti; pNO in 17 pazienti e pN1 in 5 pazienti. La remissione patologica completa è stata del 40,5%.

E' stato condotto anche uno studio retrospettivo sull'individuazione del DNA libero circolante con l'obiettivo di identificare sottogruppi di pazienti a diversa prognosi. La ricerca è stata fatta in collaborazione con il Dipartimento di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Tumori di Milano.

Il DNA plasmatico è stato determinato con PCR quantitativa, utilizzando l'amplificazione del gene telomerasi.

L'analisi del DNA circolante è stata eseguita in 22 pazienti, affetti da neoplasia gastrica avanzata dopo chirurgia radicale (RO): 11 pazienti erano liberi da malattia e 11 avevano presentato recidiva. I livelli del DNA plasmatico riscontrati erano sovrapponibili nei due gruppi. Nel nostro studio non è stato pertanto possibile mostrare alcuna associazione tra la concentrazione del DNA libero circolante nel plasma e la prognosi del tumore.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 979/06/00

Responsabile Scientifico Lusiani Luigi - Ente Proponente ULSS 8 di Asolo

“Trattamento extra ospedaliero della malattia trombo-embolica venosa (MTEU): definizione di strategie innovative”.

Nell'arco di 20 mesi (novembre 2000-giugno 2002), presso il servizio diagnostico di afferenza (Servizio di Angiologia, P.O.Castelfranco V.to) sono stati identificati 157 casi di TVP.

Di questi, 109 erano pazienti ospedalizzati, 48 (pari al 30.6% del totale) erano ambulatoriali.

Di questi 48 (40 con TVP prossimale, 8 distale), 22 sono stati selezionati per essere trattati a domicilio, 26 sono stati esclusi (e quindi trattati in regime di ricovero ordinario), secondo i criteri previsti dal protocollo.

Le cause di esclusione sono state: evidenza scintigrafica di embolia polmonare (asintomatica), casi; storia di trombosi venosa pregressa, ^ casi; emorragia cerebrale pregressa, 2 casi; emorragia recente, casi; emoglobina <8, 6 casi; chirurgia recente, 2 casi; insufficienza renale cronica (creatinina >2.0) 1 caso; non disponibilità del farmaco, 1 caso; non-compliance da parte di paziente e/o familiari, 6 casi; distanza eccessiva dal centro, 7 casi. In termini di pazienti, 9 sono stati

esclusi per rischio trombotico (embolia polmonare asintomatica, trombosi progressiva), 14 per rischio emorragico, 3 per cause non mediche (impedimenti tecnico-logistici).

Otto pazienti presentavano più di una causa di esclusione.

Uno dei pazienti trattati a domicilio ha sviluppato una macroematuria in seconda giornata, ed è stato ospedalizzato. Nei rimanenti 21 il trattamento domiciliare è stato condotto a termine con successo, senza eventi avversi.

I pazienti sono stati mantenuti in regime di ospedalizzazione domiciliare (ADI-HR) mediamente per 8.3 gg., ovvero per il tempo necessario alla transizione della terapia con EBPM a warfarina con INR stabilizzato.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 982/02/00

Responsabile Scientifico Messina Chiara - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Trapianto aploidentico di cellule staminali epoitiche in pazienti pediatriche affetti da leucemie ad alto rischio senza donatori familiari o da registro”.

Dal 18 giugno 2000 al 25 maggio 2003 sono stati eseguiti 10 trapianti aploidentici da donatore familiare in 10 pazienti affetti da leucemia linfatica acuta (n. 1), leucemia mieloide acuta (n. 4), linfoma non Hodgkin (n. 2), malattie non neoplastiche (n. 3, una linfocitosi eritrofagocitica familiare, una osteopetrosi, una sindrome di Evans refrattaria a cure immunosoppressive, chemioterapia e splenectomia).

Tutti i pazienti avevano necessità urgente di effettuare un trapianto e non avevano donatori compatibili nell'ambito familiare e dei Registri Internazionali; inoltre, relativamente ai pazienti con neoplasia, si trattava di pazienti classificabili come ad alto rischio per caratteristiche biologiche e di scarsa risposta alla chemioterapia di prima e seconda linea.

I donatori sono stati selezionati in base ai criteri di idoneità trasfusionale e di idoneità alla raccolta di cellule staminali da sangue periferico nell'ambito della famiglia: papà 7, mamma 2 e nonna 1. Tutti hanno ricevuto una stimolazione con Filgrastin, 300 µg x 2 /die per 4-6 giorni. Complessivamente sono state effettuate 25 sedute aferetiche pari ad una mediana di 3 per donatore (range 1-3). Tutte queste procedure sono state effettuate presso il Centro Emaferesi dell'Azienda Ospedaliera di Padova con macchina COBESPECTRA.

La selezione delle cellule staminali CD34 è stata effettuata presso il Laboratorio trapianto della Clinica di Oncoematologia Pediatrica mediante CliniMACS. La selezione è stata effettuata entro 24 ore dalla raccolta.

Il numero mediano di CD34/Kg x 10⁶ infuso per singolo paziente è stato di 26.3 (range 11.18- 84.8).

Il numero mediano di CD3/Kg x 10⁴ è stato di 2.4 (range 0,3 - 8).

Il numero mediano di CD19/Kg x 10⁴ è stato di 70 (range 15 - 148).

Tutti i pazienti hanno ottenuto l'attecchimento ematologico completo sia per polimorfonucleati che per piastrine entro il primo mese del trapianto. In nessun caso è stata osservata una malattia di trapianto contro l'ospite di grado \geq II-IV. Solo in un caso si è avuta una GVHD cronica estesa.

Attualmente, 4 pazienti sono vivi dopo 1, 2, 25, 28 mesi dal trapianto.

Le cause di morte dei rimanenti pazienti sono state: aspergilloso polmonare e/o cerebrale, n. 2; malattia linfoproliferativa F.PW correlata, n. 1; rigetto a recidiva, n. 3. Tutti i decessi sono avvenuti entro 9 mesi dal trapianto. Per quanto riguarda i donatori stimolati con G-CSF, questi vengono regolarmente monitorati dal punto di vista clinico ed ematologico ogni 12-18 mesi e al momento non c'è da segnalare nessun effetto indesiderato.

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Sono stati effettuati 10 trapianti in pazienti non altrimenti curabili con i trattamenti convenzionali per le caratteristiche biologiche della malattia di base e/o della scarsa risposta ai precedenti trattamenti.

Tutti i pazienti non avevano un donatore familiare o un donatore disponibile nell'ambito dei registri internazionali di donatori di midollo osseo.

Tutti i pazienti hanno attecchito e la sopravvivenza ottenuta costituisce un risultato promettente.

Questa ricerca ha permesso di dimostrare:

- che il trapianto aploidentico può essere una valida alternativa anche in ambito pediatrico per i pazienti che necessitano di trapianto urgentemente e per i quali non vi è la disponibilità di donatori;
- che il trapianto aploidentico mediante selezione immunomagnetica delle cellule CD34 raccolte dal sangue periferico del donatore è una tecnica altamente efficiente in grado di garantire l'attecchimento ematologico nella totalità dei casi trattati;
- che la sopravvivenza a lungo termine nel trapianto aploidentico è condizionata più che in altri tipi di

trapianti da comparsa di gravi infezioni fungine e virali. Per questo aspetto il trapianto aploidentico va associato a terapie antivirali antifungine e a programmi di immunoterapia antinfettiva adottiva. Questo tipo di trapianto potrà avere in futuro un impiego più allargato nell'ambito delle malattie non neoplastiche in cui il trapianto va effettuato mediante metodiche che assicurano l'assenza della malattia trapianto contro l'ospite (GVHD).

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 984/06/00

Responsabile Scientifico Montresor Paolo - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Verona

“Valutazione degli effetti della risterilizzazione dei dispositivi medici definiti monouso”.

L'attenzione che viene posta sul contenimento della spesa sanitaria si rivolge anche all'acquisto di dispositivi medici, molti dei quali sono monouso, poiché comporta un notevole impegno economico.

Correlando questo aspetto alla necessità di ridurre la produzione di rifiuti sanitari in base al D. Lgs. 22/97 e successive modifiche ed integrazioni, ci si è chiesti se vi fosse la possibilità di riutilizzare anche i dispositivi medici monouso ottenendo così un risparmio sia sulla spesa degli stessi sia sulla produzione di rifiuto.

Lo scopo della ricerca è definire se è possibile, rispettando la normativa, il ritrattamento ed il successivo riutilizzo dei presidi medici definiti monouso.

I dispositivi medici monouso sono concepiti e destinati per essere utilizzati una sola volta.

L'indicazione monouso, che fa parte dell'etichetta del dispositivo, è un'istruzione specifica a non ritrattare né riutilizzare il dispositivo dopo la prima utilizzazione.

In base alla Direttiva Dispositivi Medici 93/42/CEE (recepita in Italia con il D. Lgs. n° 46/97), un dispositivo che sia stato ritrattato ai fini del riutilizzo deve seguire le medesime procedure previste per un prodotto di nuova immissione in commercio. In questo caso, non sarà più il fabbricante originale a dover garantire la conformità ai requisiti della direttiva, ma colui che ha provveduto al ritrattamento.

Il mancato rispetto dell'indicazione monouso, implica un impiego diverso da quello previsto dal fabbricante e coloro che effettuano il riutilizzo debbono assumersene la completa responsabilità.

La Direttiva, che è entrata in vigore il primo Gennaio 1995 e prevedeva un periodo transitorio fino al 14 Giugno 1998, regola l'immissione in commercio dei dispositivi (siano essi monouso o riutilizzabili) contrassegnandoli con la marcatura CE.

Dopo questo periodo i dispositivi medici, ad esclusione di quelli su misura e di quelli destinati ad indagini cliniche, devono portare la marcatura CE ad indicare la loro conformità ai requisiti essenziali della Direttiva verificata prima dell'immissione in commercio.

La Direttiva è indirizzata a tutti i fabbricanti dei dispositivi medici.

In altre parole, l'Ente che procede al ritrattamento di un dispositivo medico monouso dovrà essere in possesso della necessaria autorizzazione per apporre una nuova marcatura CE sul dispositivo ritrattato.

Il marchio CE rappresenta la garanzia, per il paziente e per l'utilizzatore, che il dispositivo risponde a requisiti severi in materia di sicurezza e funzionalità.

Per l'ottenimento di tale marchio, le aziende produttrici devono fornire all'Ente Notificato garanzie di qualità sia del prodotto sia del sistema di produzione. Per poter apporre il marchio CE, i fabbricanti sono obbligati per legge a dimostrare che i prodotti da essi fabbricati e distribuiti in Europa soddisfano i "requisiti essenziali" della Direttiva¹. Il lungo elenco dei requisiti garantisce un alto grado di sicurezza e funzionalità per i dispositivi, in relazione ai rischi e benefici che essi possono presentare per i pazienti e gli utilizzatori. Il fabbricante deve procedere ad una classificazione dei dispositivi medici in funzione dei rischi potenziali che la loro utilizzazione può comportare. I dispositivi a più alto rischio fanno parte della classe III identificati come quelli che entrano a diretto contatto con tessuti normalmente sterili.

È POSSIBILE IL RIUTILIZZO DEL MONOUSO

Il D. Lgs. 46/97 è applicato a tutti i dispositivi medici ed ai relativi accessori.

In base a questo decreto un dispositivo che sia stato ritrattato ai fini del riutilizzo, deve seguire le medesime procedure previste per un prodotto di nuova immissione in commercio.

La letteratura ci porta a testimonianza anni di gestione silenziosa, da parte di strutture sanitarie private e pubbliche, nella pratica del riutilizzo.

Partendo dal 1975 ad oggi, nel mondo, sono state elaborate linee guida e fatti studi, per accertare la validità di un'idea: riutilizzare un dispositivo ritenuto dalla ditta produttrice monouso, non è del tutto sbagliato se questo dispositivo segue procedure di decontaminazione, lavaggio e sterilizzazione sicure.

In questi studi vengono evidenziati vantaggi e rischi per arrivare alla conclusione che alcuni dispositivi, di classe III, possono essere ricondizionati e riutilizzati senza recare danno al paziente.

L'America definisce linee guida da seguire nel ritrattamento di dispositivi medici monouso, secondo le quali si è tenuti a dimostrare che le procedure di decontaminazione lavaggio e sterilizzazione sono state eseguite in modo corretto, che le caratteristiche fisiche del dispositivo non si sono alterate garantendo, così, sicurezza ed efficienza del dispositivo sul paziente.

In Italia le disposizioni del D. Lgs. sopra citato rappresentano un riferimento importante per la gestione dei dispositivi medici e dei loro accessori, non nega la possibilità di riutilizzo di questi dispositivi, ma specifica, nell'allegato I (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale), che devono essere sterilizzati con un metodo convalidato e appropriato.

Le strutture sanitarie australiane e svedesi approvano la pratica del riutilizzo solo su pazienti preventivamente informati.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 985/02/00

Responsabile Scientifico Nicolao Piero - Ente Proponente Università di Padova

“Ruolo degli anticorpi antineurone nella diagnosi precoce di neoplasia”.

PREMESSA

Durante i due anni di attività di ricerca, presso il laboratorio della Clinica Neurologica II dell' USSL 16 di Padova, sono stati raccolti i campioni di siero e, quando disponibile, di liquor di 450 pazienti affetti da sospetta sindrome neurologica paraneoplastica (SNP). Su questi campioni, provenienti in buona parte da reparti di Neurologia di altre regioni, è stato eseguito lo screening di base per la ricerca di anticorpi anti-neurone. Nel secondo anno di attività, inoltre, sono stati raccolti i sieri di pazienti affetti da neoplasie senza sintomatologia neurologica, al fine di valutare la specificità degli anticorpi antineurone per le sindromi neurologiche paraneoplastiche, e l'influenza della risposta immunitaria responsabile dei sintomi neurologici, sulla progressione della malattia neoplastica.

Sono stati pertanto analizzati, nel laboratorio della Clinica Neurologica II di Padova, mediante metodiche di Immunoistochimica su cervelletto di ratto e di Western-Slot su estratti di proteine neuronali e su proteine ricombinanti, campioni di circa 450 pazienti affetti da sospetta SNP.

Tra i casi analizzati, vi sono 44 pazienti affetti da microcitoma polmonare - dei quali 28 senza alcuna sintomatologia neurologica, e 16 che presentavano sintomatologia di sospetta origine paraneoplastica - e 60 pazienti affetti da neoplasia mammaria od ovarica senza alcuna sintomatologia neurologica. Le metodiche di Immunoistochimica e Western-Blot, utilizzate durante lo studio, sono state descritte nel programma del progetto di ricerca, mentre, per l'esecuzione dell' Western-Blot su proteine ricombinanti, è stato acquistato un kit commerciale (Milenia Biotech - Bad Nauheim, D) che utilizza strisce di nitrocellulosa blottate con antigeni neuronali ricombinanti: Yo, Hu, Ri ed Anfifisina.

<i>Malattia</i>	<i>N° pazienti I Anno</i>	<i>N° positivi I Anno</i>	<i>N° pazienti II anno</i>	<i>N° positivi II Anno</i>
Sindromi cerebellari	38	4	33	8
Polineuropatie	57	7	43	5
Encefalopatie	44	7	11	2
Altre patologie neurologiche di sospetta origine Paraneoplastica	91	13	127	6
Totale 1 anno - II anno	230	31	214	21
Totale Pazienti – positivi	444	52		

Su tutti questi sieri è stato condotto lo studio immunocitochimico e di Western Blot per la ricerca di anticorpi anti-neurone con le modalità applicate di routine nella diagnostica clinica ed ormai standardizzate a livello internazionale.

Il tipo di positività antineurone riscontrato è riportato nella seguente tabella:

<i>Malattia</i>	<i>N° positivi</i>	<i>Tipo di positività</i>
Sindromi Cerebellari	12	7 anti-Yo 2 anti-Hu 2 atipici 1 anti-GAD
Polineuropatie	12	2 anti-Hu 7 atipici 3 reatt. sistemiche
Encefalopatie	9	1 anti-Hu 4 atipici 3 anti-GAD 1 reatt. sistemiche
Altre patologie	19	6 anti-Hu 7 atipici 4 anti-GAD 1 anti-anfifisina 1 reatt. sistemiche

Nel secondo anno del progetto, sono stati analizzati 214 sieri di pazienti affetti da sospetta sindrome neurologica paraneoplastica. Di questi pazienti, 21 sono risultati positivi per anticorpi antineurone. Oltre a 6 pazienti risultati affetti da sindrome anti-Hu, 4 sono risultati positivi per anticorpi anti-Yo, 1 per anticorpi anti-anfifisina, 3 per anticorpi anti-GAD (nell'ambito di una sindrome poliendocrina autoimmune non-paraneoplastica), mentre i rimanenti 7 casi presentavano reattività verso antigeni neuronali non ancora caratterizzati. E' stato compiuto, inoltre, uno studio particolareggiato su 44 pazienti affetti da microcitoma polmonare, suddivisi in due gruppi:

- pazienti con microcitoma, senza sintomatologia neurologica:

dei 12 pazienti affetti da microcitoma senza sintomi neurologici analizzati (11 microcitomi polmonari ed un microcitoma del rinofaringe); in un solo caso è stata riscontrata una positività anticorpale sierica per anticorpi anti-Hu a titolo significativo. L'evoluzione clinica della malattia neoplastica è stata quella attesa in tutti i pazienti. Il paziente che presentava anticorpi anti-Hu a titolo significativo, ha presentato, durante il follow-up, una polineuropatia sensitiva di origine paraneoplastica, confermando l'elevato valore predittivo degli anticorpi tipici per lo sviluppo di tali sindromi.

- pazienti con microcitoma e sintomatologia neurologica:

dei 16 pazienti con sintomatologia neurologica, 15 presentavano un microcitoma a localizzazione polmonare ed uno presentava una neoplasia a sede ischiatica, con reattività cellulare specifica per antigeni neuronali (Enolasi Neurone Specifica).

Il quadro neurologico presentato dai pazienti era: encefalomieloneurite in 2, atassia cerebellare in 5, encefalopatia in 2, neuropatia periferica in 3, encefalite del tronco in 3 e sindrome miastenica in 2. In questi pazienti, la positività sierica e liquorale per anticorpi antineurone, del tipo anti-Hu, è stata riscontrata in 8 casi (50%).

CONCLUSIONI

In tutti i pazienti con sospetta SNP che hanno mostrato un pattern di positività anticorpale già caratterizzato (anti-Hu e anti-Yo) sono stati riscontrati tumori polmonari a piccole cellule e tumori mammari o ovarici come atteso. Il test con proteine ricombinanti ha confermato in tutti questi casi la specificità del riscontro della reattività. È stato osservato un discreto numero di reattività anti-GAD in casi con sospetta malattia paraneoplastica; ciò dimostra che lo spettro di malattie in cui è possibile osservare una positività anti-GAD è molto più ampio di quanto ritenuto finora. In nessuno di questi pazienti è stata riscontrata una neoplasia, mentre, nella maggioranza dei casi, è stata diagnosticata una sindrome poliendocrina autoimmune.

Un aspetto interessante dello studio condotto è la numerosità delle reattività atipiche riscontrate. Le reattività atipiche definiscono la presenza di anticorpi che reagiscono con antigeni neuronali con un pattern diverso da quelli già descritti in letteratura (Hu, Yo, Ri, Tr, Ta, Cv, Anfifisina, CRMP5, GAD). I pazienti con reattività atipiche sono stati seguiti con un follow-up clinico per valutare l'eventuale tipologia dei tumori associati. In nessuno dei pazienti con reattività atipiche è stata comunque al momento riscontrata una neoplasia. La presenza di un numero non irrilevante di pazienti che presentano a livello sierico e liquorale anticorpi anti-neurone atipici sembra confermare l'ipotesi che lo spettro di reattività antineurone in pazienti paraneoplastici sia più ampio di quanto si ritenga. Nel gruppo di pazienti affetti da microcitoma che presentavano sintomatologia neurologica, è stata riscontrata un' elevata percentuale di positività per anticorpi anti-neurone (50%). Tale dato riflette l' attenta selezione dei pazienti da parte delle strutture cliniche che hanno inviato i campioni, in quanto, tutti i pazienti in cui era stata accertata l'origine metabolica, metastatica o iatrogena della sintomatologia neurologica, non sono stati inclusi nello studio.

Nei pazienti con positività per anticorpi anti-Hu, il fenotipo neurologico ha mostrato un' estrema variabilità, compresa la possibilità di un interessamento uni- o multifocale del sistema nervoso. Il follow-up clinico dei due gruppi di pazienti affetti da microcitoma - con o senza sintomatologia neurologica - è stato troppo breve per mettere in luce differenze statisticamente significative sul decorso della malattia neoplastica; tuttavia, tra i pazienti che presentavano positività per anticorpi anti-Hu, vi sono stati due casi di remissione completa della malattia neoplastica (diagnosticata alla biopsia), che continuava dopo un follow-up di 8 e 10 anni rispettivamente. Questo riscontro supporta l'ipotesi di un ruolo protettivo della risposta anticorpale anti-Hu nella prognosi della neoplasia, anche se la sintomatologia neurologica in questi pazienti è il più delle volte fortemente invalidante. In tutti i pazienti non neoplastici che presentavano sintomatologia neurologica sospetta per SNP, è stato possibile diagnosticare, mediante un follow-up ed esami diagnostici mirati, la presenza di una neoplasia, che si è rivelata dell' istotipo atteso - mammaria od ovarica per gli anti-Yo e polmonare a piccole cellule per gli anti-Hu. Questi dati confermano l'utilità della diagnostica anticorpale nella diagnosi precoce di neoplasia.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 986/02/00

Responsabile Scientifico Ninfo Vito - Ente Proponente Università di Padova

“Diagnosi molecolare fenotipizzazione dei sarcomi dei tessuti molli”.

- 1) Per quanto riguarda i sarcomi dei tessuti molli dell'infanzia si è riusciti, con la collaborazione dell'Oncologia Pediatrica ad integrare la immunofenotipizzazione, ed i dati genici con una più precisa diagnosi di istotipo (rabbdomiosarcoma alveolare vs rabbdomiosarcoma embrionale) e di conseguenza cercare di ottimizzare la previsione diagnostica. Si è infatti ribadito la specificità della traslocazione $t(11;22)$ come marker diagnostico per la variante alveolare del rabbdomiosarcoma.
- 2) Tramite uno studio di fenotipizzazione dei tumori a piccole cellule rotonde si è verificata la validità dell'anticorpo monoclonale verso la proteina FLI-1, come marker di diagnosi differenziale in questo gruppo di neoplasie. I nostri risultati indicano che FLI-1 può essere applicato utilmente nella diagnostica routinaria dei tumori a piccole cellule dei tessuti molli confermandone l'importanza come marker di differenziazione endoteliale e per certi versi anche nel sarcoma di Ewing.
- 3) Lo studio di alcune neoplasie dei tessuti molli a comportamento biologico ben definito (ad esempio il cosiddetto Tumore fibroso solitario dei tessuti molli) è stato eseguito anche in collaborazione con l'Università di Siena. I risultati ottenuti dimostrano che l'attività telomerasica, la valutazione dell'indice di proliferazione Ki67 e l'espressione della Ciclica D1 correlati con l'indice di Apoptosi, dimostrano che questi possono rappresentare, nei tumori dei tessuti molli a malignità cosiddetta “intermedia”, i criteri patologici aggiuntivi per la loro determinazione prognostica.
- 4) Alcuni sarcomi, pur essendo quasi esclusivi dell'età pediatrica, possono sporadicamente sorprendentemente presentarsi anche nell'età adulta. Tali neoplasie, poco indagate e misconosciute sono state valutate sia morfologicamente, che tramite indagini immunoistochimiche e di biologia molecolare,

sollevando interessanti quesiti che riguardano le possibili basi biologiche che condizionano aggressività diverse dello stesso sarcoma a seconda della fascia di età (adulta o infantile)

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Si è raggiunta una quasi ottimale omogeneizzazione nei vari servizi di Anatomia Patologica della Regione Veneto dei criteri diagnostici e di valutazione di indici prognostici, nonché del corretto uso delle indagini immunoistochimiche.

Tale obiettivo è stato conseguito tramite la continua centralizzazione a Padova dei vari sarcomi diagnosticati nella nostra Regione.

Si è creato così un Centro di Riferimento prima Regionale e poi Nazionale per lo studio dei Sarcomi dei Tessuti molli.

A conferma di ciò, recentemente una ricerca Europea sui sarcomi (CONTICANET) ha individuato nella Regione Veneto l'unica partecipante italiana allo studio.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 987/02/00

Responsabile Scientifico Paccagnella Adriano - Ente Proponente ULSS 12 Veneziana

“Chemioterapia concomitante da sola o preceduta da chemioterapia neoadiuvante. Studio randomizzato multicentrico di fase III nei pazienti con carcinoma del Capo e Collo allo stadio III o IV inoperabili”.

I tumori squamosi del capo e del collo rappresentano all'incirca il 4% di tutti i tumori nel maschio ed il 2% nelle femmine. Circa i 2/3 dei pazienti si presentano all'esordio con malattia in stadio III o IV, senza metastasi a distanza ma con localizzazione ai linfonodi regionali, e per l'estensione locale della malattia, non vengono ritenuti suscettibili di intervento chirurgico.

Il trattamento dei tumori in fase localmente avanzata, inoperabili, fino a qualche anno fa prevedeva la sola radioterapia. Con tale trattamento, tuttavia, la percentuale di sopravvivenza a 5 anni risulta insoddisfacente (15-20%). Due recenti metanalisi (Munro 1999 e Pignon 2000), e successivi studi randomizzati di fase III non analizzati nelle suddette analisi, hanno dimostrato come l'aggiunta della chemioterapia al trattamento radiante migliori sia la sopravvivenza libera da malattia che la sopravvivenza globale.

In particolare, il massimo vantaggio si ottiene con la somministrazione concomitante al trattamento radiante (beneficio assoluto di sopravvivenza dell'8% a 5 anni) e, al momento attuale, tale strategia combinata costituisce il trattamento standard delle neoplasie localmente avanzate inoperabili. L'uso concomitante delle due metodiche è ovviamente gravato da una maggiore tossicità; l'effetto collaterale più rilevante è rappresentato dalle mucositi che si verificano nei tre quarti dei pazienti trattati e che rendono necessaria una adeguata terapia di supporto e nutrizionale. Rimane invece ancora da dimostrare il reale vantaggio dell'aggiunta della chemioterapia neoadiuvante (o primaria) quale trattamento di induzione al trattamento concomitante chemio-radioterapico.

Nonostante non vi siano ancora prove conclusive sull'efficacia della chemioterapia neoadiuvante nell'aumentare il controllo locale della malattia e la sopravvivenza globale in una ricerca pubblicata dal nostro Gruppo Cooperativo (GSTTC) nel 1994, quattro cicli di chemioterapia neoadiuvante con cisplatino e 5 fluorouracile, hanno dimostrato un beneficio in termini di durata della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale nei pazienti inoperabili, rispetto al solo trattamento locoregionale. Il presente progetto di studio si proponeva di valutare la fattibilità del trattamento standard di chemio-radioterapia concomitante paragonandolo allo stesso trattamento preceduto da 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante. Il regime di polichemioterapia neoadiuvante proposto prevedeva l'aggiunta di un farmaco di recente introduzione, il docetaxel, alla combinazione standard tra cisplatino e 5 fluorouracile: tale combinazione a 3 farmaci, già sperimentata in passato, ha mostrato ottimi risultati potenzialmente migliori rispetto a quelli già ottenuti con la combinazione standard tra cisplatino e 5 fluorouracile.

Il regime di chemioterapia da associare al trattamento radiante inizialmente prevedeva l'associazione tra carboplatino 70 mg/mq, per 4 giorni, in associazione al 5 fluorouracile alla dose di 800 mg/mq, in perfusione continua, per 96 ore. Era prevista l'esecuzione di 3 cicli di terapia nei giorni 1, 22 e 43 della radioterapia eseguita a frazionamento standard (66-70 Gy/33-35 fr).

Lo studio di fattibilità è iniziato nel febbraio del 2000 e, in base ai dati di tossicità rilevati nel corso dello studio, sono state apportate alcune modifiche al disegno originale.

Complessivamente sono stati valutati 24 pazienti, tutti inoperabili, con le seguenti caratteristiche:

età mediana: 59 anni (41-73);

rapporto M/F: 19/5;

PS > 90: 17 pz; PS =70-80: 7 pz,

stadio II / III/IV MO: 1/6/17pz

I 24 pazienti trattati possono essere suddivisi in 3 diversi gruppi:

- 8 pazienti hanno ricevuto 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante seguiti da 3 cicli di chemioterapia concomitante alla radioterapia;
- 8 pazienti hanno ricevuto solo 3 cicli di chemioterapia concomitante alla radioterapia;
- il terzo gruppo di pazienti, gli ultimi 8 trattati, ha ricevuto 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante e, durante la radioterapia, ha ricevuto 2 soli cicli di chemioterapia concomitante con cisplatino 20 mg/mq 1-4 g + 5 fluorouracile 800 mg/mq, in perfusione continua, per 96 ore, durante la prima e la sesta settimana della radioterapia.

La modifica rispetto al disegno originale dello studio, si è resa necessaria dato il riscontro, nei primi 16 pazienti trattati, di un eccesso di mucositi di grado 3 /4 durante il trattamento radiante, che non consentiva il completamento del trattamento stesso. La tossicità ematologica di grado 3/4 secondo la scala WHO osservata durante il trattamento concomitante, seppure non particolarmente invalidante, è stata osservata solo nei pazienti che, secondo il disegno originale dello studio, avevano eseguito 3 cicli di chemioterapia concomitante alla radioterapia. Analogamente, anche la tossicità non ematologica, in particolare la mucosite e la perdita di peso, erano più pronunciate nello stesso gruppo di pazienti, senza tuttavia rilevare differenze tra quelli che avevano ricevuto solo il trattamento concomitante e il gruppo che aveva ricevuto anche 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante.

L'analisi della tossicità limitata ai 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante si è invece dimostrata accettabile e sovrapponibile ai dati noti della letteratura in cui viene utilizzato lo stesso regime polichimioterapico.

Per quanto riguarda il supporto nutrizionale, inizialmente era previsto che tutti i pazienti avessero un supporto di tipo enterale al momento in cui iniziavano il trattamento combinato o, in alternativa, un supporto parenterale. In seguito all'osservazione che, nei primi 5 pazienti trattati con 2 soli cicli di chemioterapia concomitante alla radioterapia il grado massimo osservato di mucosite era G2, l'indicazione al supporto nutrizionale, enterale o parenterale, veniva posta su indicazione clinica.

L'efficacia del trattamento in termini di percentuale di risposte complete è stata del 62,5 % nei pazienti sottoposti al solo trattamento chemioradioterapico e del 77% in quelli che avevano ricevuto anche i 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante.

Tale studio di fattibilità ha consentito di arrivare alle seguenti conclusioni:

- 2 cicli di chemioterapia con cisplatino e 5 fluorurate in concomitanza al trattamento radiante sono fattibili in assenza di tossicità limitanti.
- 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante con docetaxel, cisplatino e 5 fluorouracile sono ben tollerati e non compromettono il successivo trattamento combinato.

OBIETTIVI CONSEGUITI. RICADUTE PER IL SSR

I dati di questo studio di fattibilità sono stati oggetto di presentazione al Congresso della Società Italiana di Oncologia Medica tenutosi a Torino nel settembre 2002 sotto forma di poster e, più recentemente, sono stati presentati alla riunione internazionale del 2002 delle EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) sulle neoplasie della testa e del collo tenutosi a Padova nel novembre u.s.

Tali dati hanno costituito il razionale per il disegno definitivo di uno studio randomizzato di fase III, sponsorizzato dalla Ditta Aventis, che confronta l'efficacia del trattamento chemioradioterapico concomitante da solo o preceduto da chemioterapia, che coinvolge numerosi Centri di tutta Italia e che è partito nel dicembre 2002.

L'originalità dello studio sta nel fatto che, rispetto a studi europei e americani, adotta quale braccio di trattamento standard il trattamento chemioradioterapico concomitante, come recentemente suggerito dai dati più recenti della letteratura.

I risultati di questo studio di fattibilità dimostrano la possibilità di adeguare il trattamento di queste neoplasie agli standard internazionali e di poter integrare l'attività di lavoro multidisciplinare.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 991/02/00

Responsabile Scientifico Sacerdoti David - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova

“Utilità del mezzo di contrasto ecografico e delle nuove tecnologie eco color doppler (2^a armonica e pulse inversion) nella diagnosi dell'epatocarcinoma, delle metastasi epatiche e delle lesioni epatiche benigne e nella valutazione dell'efficacia della terapia locale (alcolizzazione e radiofrequenza): confronto con la tac spirale”.

Abbiamo innanzitutto studiato la cinetica del mezzo di contrasto ecografico dimostrando delle alterazioni caratteristiche nella cirrosi, utilizzabili a scopo diagnostico. Lo studio delle curve di transito del Levovist

utilizzando un basso indice meccanico, la 2° armonica, la pulse-inversion ed un software dedicato (HDI-lab), ha evidenziato innanzitutto come nella cirrosi vi sia una precoce comparsa del mezzo di contrasto a livello sovraepatico (22 ± 8 sec; $n=20$ vs 40 ± 9 sec; $n=8$; $p < 0,05$), anche rispetto all'epatite cronica (32 ± 6 sec; $n=17$) ove non è risultata una correlazione con i parametri istologici. Come confermato anche da studi successivi, tempi di comparsa del Levovist a livello sovraepatico inferiori a 24 secondi consentono di fare diagnosi di cirrosi con una sensibilità dell'85-100% ed una specificità del 75-96%, simili a quelle della biopsia. A livello arterioso epatico e portale il tempo di comparsa del Levovist non è risultato differente nei soggetti di controllo, nei cirrotici e negli epatitici (arteria $16,9 \pm 4,7$; $15,4 \pm 3,5$; $14,1 \pm 2,6$ sec., v. porta: $21,2 \pm 8,4$; $20,8 \pm 5,1$; 17 ± 4 sec; media \pm SD). Nei cirrotici il coefficiente angolare della curva di wash-in è risultato significativamente più basso rispetto ai controlli ($0,63 \pm 0,5$ vs $2,4 \pm 1,8$ $p < 0,001$), come pure il livello massimo di segnale ($16,1 \pm 10,4$ vs $50,5 \pm 24,2$ $p < 0,005$) senza sovrapposizione di valori. Il coefficiente angolare portale è risultato inversamente correlato con l'indice di congestione portale, l'indice di pulsatilità arteriosa epatica ed il diametro bipolare della milza, rappresentando quindi un parametro verosimilmente correlato con l'ipertensione portale. Infine, la somministrazione di Levovist in pazienti cirrotici con ipertensione portale, pur causando un aumento degli indici di resistenza arteriosa epatica, non ha determinato ulteriori aumenti della pressione portale (cateterismo delle vene sovraepatiche) ed è quindi da considerarsi "safe" anche da questo punto di vista.

I dati sui tempi di comparsa del contrasto nei vari distretti vascolari sono stati indispensabili per la messa a punto della tecnica di esecuzione degli esami finalizzati alla diagnostica delle lesioni focali epatiche. Dopo aver valutato diversi approcci, in considerazione delle caratteristiche del Levovist (l'unico inizialmente disponibile in commercio), dell'uso della 2° armonica e della pulse-inversion, e dello scopo dell'esame, sono state identificate due metodiche diverse: a) la prima per la caratterizzazione delle lesioni visualizzabili senza mezzo di contrasto e per la valutazione dell'efficacia della terapia locale, con infusione in bolo rapido; b) la seconda per l'individuazione di aree sospette non visualizzabili senza mezzo di contrasto, con infusione continua lenta mediante pompa, utilizzando un elevato indice meccanico ($MI=1,3$), che consente di distruggere le microbolle, e sincronizzando l'eco-Doppler con l'ECG con un frame-rate di 1/battito cardiaco. Così abbiamo potuto ottenere un'immagine con le microbolle seguita da una senza a causa della loro precedente rottura. Con il Sonovue, la cui visualizzazione con un basso indice meccanico, la 2° armonica e la pulse inversion, è molto migliore, specie nella fase precoce, gli esami sono stati effettuati solo con bolo rapido di ½ fiala. Sia il Levovist che il Sonovue, quest'ultimo usato in un minor numero di pazienti, sono risultati utili per la caratterizzazione delle lesioni focali epatiche consentendo di ottenere informazioni sostanzialmente sovrapponibili a quelle della TAC con mezzo di contrasto, specie con il Sonovue. Nei pazienti con noduli sospetti di HCC all'ecografia, utilizzando il quadro di precoce visualizzazione in fase arteriosa come criterio diagnostico, la diagnosi di HCC è stata confermata in 32 pazienti su 36 con il Levovist ed in 15 su 17 con il Sonovue.

In 10/12 pazienti con sospetto angioma epatico l'esame con Levovist ha confermato la natura angiomatosa della lesione, compresi 3 angiomi atipici, mostrando un quadro di assente vascolarizzazione precoce in fase arteriosa e di lieve opacizzazione in fase molto tardiva. In 6/7 pazienti studiati con Sonovue è risultato il caratteristico quadro di opacizzazione centripeta.

In 6 pazienti con aree di incerta caratterizzazione (aree atipiche di risparmio da steatosi) l'esame con Levovist ha in tutti confermato il sospetto ecografico, successivamente confermato dalla negatività della TAC con mezzo di contrasto.

In 7 pazienti con sospetta iperplasia nodulare focale, di cui 2 con quadro atipico all'eco-color-Doppler, l'esame con Levovist/Sonovue ha confermato il sospetto, successivamente convalidato anche dalla TAC.

In 28 pazienti con HCC trattati con terapia locale (alcolizzazione o radiofrequenza) l'esame con Levovist ha evidenziato, in 6 casi in cui l'esame color-Doppler aveva mostrato l'assenza di segnali vascolari, la presenza di vascolarizzazione e quindi l'insufficiente eradicazione della malattia, evitando di eseguire la TAC. Dei pazienti in cui non era visualizzabile alcuna vascolarizzazione né accumulo di contrasto, solo 1 presentava mancanza di eradicazione della malattia alla TAC. In un paziente con sospette lesioni secondarie (metastasi) da K polmonare e quadro TAC dubbio, l'esame con Sonovue ha permesso di escludere la presenza di lesioni maligne, ponendo la diagnosi di ascessi epatici, successivamente confermato.

Per quanto riguarda la ricerca di lesioni focali epatiche non visualizzabili ecograficamente, abbiamo studiato 60 pazienti con Levovist e 40 con Sonovue. Il Levovist ha permesso di identificare noduli non visualizzati all'ecografia in 8 su 12 pazienti nei quali sono stati poi riscontrati alla TC con mezzo di contrasto, il Sonovue in 3 su 8. Nei pazienti con ecografia negativa l'esame con Sonovue ha mostrato aree sospette in 5 casi, non confermate dalla TAC. In 2 di questi casi nel follow-up è stata però confermata la diagnosi di HCC.

Purtroppo non è stato possibile eseguire lo studio sistematico delle metastasi epatiche ove, nei casi sporadici giunti alla nostra osservazione, è risultato di potenziale utilità nel mostrare lesioni non visualizzabili con la sola

ecografia, non essendo ipotizzabile di eseguire ripetute TAC con mezzo di contrasto nel follow-up di pazienti operati ad esempio per neoplasie mammarie o gastrointestinali.

In conclusione: il mezzo di contrasto ecografico, da usarsi unicamente se è disponibile un'apparecchiatura idonea, con software dedicato, può consentire di fare la diagnosi di cirrosi ed è molto utile per la caratterizzazione delle lesioni focali epatiche, sia in fegati normali che cirrotici, e per la valutazione dell'efficacia delle terapie locali dell'HCC, consentendo un notevole risparmio di esami invasivi come la TAC. A tal fine i mezzi di contrasto non sono equivalenti: il Levovist ha migliore efficacia nella fase tardiva mentre il Sonovue consente una valutazione simile a quella della TAC in fase precoce arteriosa. Di conseguenza il Levovist sembra migliore nella diagnosi di lesioni non visualizzate all'esame ecografico di base (screening dell'HCC in pazienti con ecografia negativa o dimostrazione di altri noduli in pazienti con ecografia positiva) essendo la fase arteriosa precoce valutabile prevalentemente in lesioni visualizzabili direttamente senza contrasto, mentre il Sonovue è nettamente migliore per la caratterizzazione tissutale.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 992/02/00

Responsabile Scientifico Stracca Pansa Vincenzo - Ente Proponente ULSS 12 Veneziana

“I linfomi B della cute: caratterizzazione biologica (istologia immunofenotipica e molecolare) per la definizione di nuovi standard diagnostici in una casistica multicentrica”.

“I Linfomi B Primitivi della Cute sono processi linfoproliferativi maligni, caratterizzati all'esordio da esclusivo interessamento cutaneo, ed assenza di manifestazioni extra-cutanee (documentata da complete indagini di stadiazione) per un periodo di almeno 6 mesi dall'esordio”

Sulla base di questa definizione i patologi coinvolti nello studio hanno provveduto a ricercare, negli archivi degli Istituti di Anatomia patologica di Venezia, Padova, Vicenza, Bassano e Castelfranco, i casi diagnosticati come linfomi B primitivi cutanei o processi linfoproliferativi B nel periodo 1985-1998.

I casi raccolti sono 165, tutti inseriti in un database informatico costruito allo scopo.

Tali casi sono stati sottoposti a revisione istopatologica, sia dei vetrini allestiti in Ematossilina Eosina, sia degli eventuali preparati di immunoistochimica eseguiti al momento della primitiva diagnosi, da parte di un panel di patologi (Dr. Vincenzo Stracca Pansa, dr. Emanuele D' Amore, dr.ssa Emanuela Bonoldi, Dr. Antonio Scapinello) che ha provveduto a riclassificare i casi secondo la classificazione EORTC e WHO. (EORTC 1988, Cutaneous Lymphoma Study Group, Willemze R et al. Blood 90. 354-371, 1997 e WHO 1997) nei gruppi diagnostici: pseudolinfomi e iperplasie linfoidi reattive, linfomi B follicolari, linfomi tipo SALT, linfomi a grandi cellule, miscellanea.

Successivamente è stato invitato un patologo, il prof. Lorenzo Cerroni, Università di Graz, internazionalmente riconosciuto come uno dei massimi esperti di patologia linfoproliferativa cutanea, a cui sono stati sottoposti, e discussi collegialmente in un meeting di due giorni (24 e 25 aprile 2001), i casi di particolare difficoltà diagnostica

La notevole mole di lavori scientifici prodotti negli ultimi tempi, anche per l'interesse verso una patologia, quella dei linfomi extranodali, con un accertato trend ad aumento di incidenza nel mondo, ha impegnato i ricercatori ad una analisi della letteratura sull'argomento specifico e ai temi correlati, con relativa raccolta di lavori originali e abstracts.

Nell'ambito della caratterizzazione dei casi dal punto di vista biologico, si è provveduto al taglio di 15 sezioni di 5 o 15 micron da ogni blocchetto di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina recuperato dagli archivi. Tali sezioni sono state destinate in parte alla caratterizzazione immunoistochimica dei casi, e in parte allo studio e alla verifica della clonalità mediante tecniche di biologia molecolare.

BIOLOGIA MOLECOLARE

A tale scopo, è stato utilizzata nei laboratori di Biologia Molecolare dei Servizi di Anatomia Patologica di Venezia e di Vicenza la seguente metodica:

- **ESTRAZIONE DI DNA**

5-10 sezioni di tessuto (a seconda delle dimensioni) fissato in formalina ed incluso in paraffina dello spessore di 10 µm in Eppendorf, vengono sparaffinate con 2 passaggi in Xilolo e 2 in Etanolo assoluto. Il pellet viene quindi seccato completamente e digerito con Tris HCl 10 M pH 8.3, Nonidet 0.5% e Proteinasi K.

La miscela di digestione viene quindi incubata a 55°C ON e quindi bollita per 10', centrifugata e recuperato il surnatante che fungerà da templatato per le successive amplificazioni.

- **ANALISI DI CLONALITA' DELLE IMMUNOGLOBULINE**

L'analisi di clonalità prevede l'utilizzo di due approcci che consentono l'amplificazione selettiva di 2 regioni FR3A ed FR2) risultanti dal processo di riarrangiamento del gene della catena pesante delle immunoglobuline.

AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE FR3A

Primers utilizzati:

FR3A 5'- ACA CGG CYS TGT ATT ACT GT -3'

LJH 5'- TGA GGA GAC GGT GAC C -3'

VLJH 5'- GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG -3'

Il protocollo consiste di 2 amplificazioni (protocollo seminested), la prima con i primers FR3A e LJH, la seconda con FR3A e VLJH.

La prima miscela di PCR è così costituita: KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.3, 20 pmoli di ogni primer, 125 µM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 1 U di Taq polymerase e 100-200 ng di DNA genomico, ad un volume finale di 30 µl. i campioni vengono quindi sottoposti a 20 cicli con i seguenti parametri tempo/temperatura: 45" a 94°C, 45" a 55°C e 45" a 72°C preceduti da 5' di denaturazione e seguiti da 7 minuti di estensione.

La seconda miscela di PCR consiste di : KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.3, 40 pmoli di ogni primer, 200 µM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 1.25 U di Taq polymerase e 1 ul di DNA amplificato nella prima PCR, ad un volume finale di 30 µl. i parametri della seconda PCR sono: 94°C 5', 25 cicli di 30" a 94°C, 30" a 58°C e 60" a 72°C, e 7' a 72°C.

15 ul di amplificato vengono poi controllati in NuSieve 3%.

AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE FR2

Primers:

FR2 5' - TGG RTC CGM CAG SCY YCN GG - 3'

LJH 5'- TGA GGA GAC GGT GAC C -3'

VLJH 5'- GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG -3'

Anche in questo caso si tratta di un protocollo seminested (FR2-LJH e FR2-VLJH). Le miscele della prima e della seconda amplificazione sono essenzialmente le stesse, ad esclusione dei primers e del DNA da amplificare

KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.3, 25 pmoli di ogni primer, 200 µM dNTPs, 3.5 mM MgCl₂, 1 U di Taq polymerase, 100-200 ng di DNA genomico (nella prima mix) oppure 2 ul di DNA amplificato (nella seconda mix) ad un volume finale di 50 ul.

Il primo ciclo di amplificazione è caratterizzato dalle seguenti temperature: 29 cicli di 30" a 94°C, 30" a 55°C e 60" a 72°C, preceduti da 5' a 94°C e seguiti da 7' a 72°C.

Nel secondo ciclo di amplificazione tempi e temperature rimangono gli stessi, ma il numero di cicli viene ridotto a 19.

20 ul di amplificato vengono poi controllati in gel NuSieve 3%.

Sono stati finora testati 38 casi: di questi, 24 sono risultati positivi con l'approccio FR2, 14 con l'amplificazione della regione FR3, e 2 sono risultati oligoclonali, sempre con approccio FR3.

Da sottolineare il dato che tutti i casi finora esaminati sono risultati idonei per quanto riguarda l'estrazione di DNA, qualunque fosse l'anno di archiviazione del caso.

IMMUNOISTOCHEMICA

La tipizzazione immunoistochimica sulle sezioni in parte allestite allo scopo è stata eseguita nel laboratorio del servizio di Anatomia Patologica di Venezia. Vengono utilizzate tecniche standard di immunoistochimica (Avidina Biotina, rivelazione con DAB o AEC) con panel di anticorpi atti a valutare il fenotipo (CD20, CD3, CD5, CD4, CD8, CD10, CD21, CD43), la clonalità (K, Lambda), i riarrangiamenti clonali di oncogeni (bcl1, bcl2), la componente dendritica follicolare (NGFR, CD21), i recettori per l'homing (CD11a, CD18, CD44) e infine la quota proliferativa (MIB1).

I risultati ottenuti sono quindi riassumibili nei seguenti punti:

- Definizione, attraverso l'analisi della notevole casistica multicentrica raccolta, di un percorso diagnostico standardizzato morfologico, fenotipico e genotipico, allo scopo di rendere omogeneo l'approccio alla diagnosi dei processi linfoproliferativi B della cute.
- Sono stati evidenziati istotipi rari e particolari, formanti casistiche che sono tuttora in corso di elaborazione e di caratterizzazione anatomo clinica per pubblicazioni e presentazioni congressuali. In particolare: Linfomi cutanei a cellule fuse, Linfomi a grandi cellule del dorso e della gamba.
- Si è creato un centro di riferimento per problematiche di diagnostica differenziale nell'ambito della patologia linfoproliferativa cutanea, fornendo la conferma diagnostica mediante una accurata caratterizzazione morfo-funzionale e biologica della lesione, e il corretto inquadramento classificativo secondo lo schema WHO e EORTC.
- Sono stati identificati correttamente i linfomi B primitivi della cute. Ciò ha consentito di avviare i pazienti verso protocolli terapeutici idonei.
- Il risultato più interessante della ricerca è stato lo studio, con metodiche di biologia molecolare, e l'accertamento del ruolo della *Borrelia Burgdorferi* nella patogenesi dei linfomi B cutanei. La casistica relativa, e il poster presentato al Congresso Nazionale SIAPEC di Genova lo scorso anno, sono illustrati in dettaglio in due elaborati separati allegati alla presente.

SINTESI RICERCA SANITARIA FINALIZZATA 993/02/00

Responsabile Scientifico Tenconi Romano - Ente Proponente Azienda Ospedaliera di Padova e Università di Padova

“Protocollo clinico, genetico e molecolare per l'identificazione dei fattori e la diagnosi precoce dei gliomi del nervo ottico nella neurofibromatosi tipo 1”.

I gliomi ottico-chiasmatici (GOC) sono rari tumori benigni raramente isolati, più frequentemente (80% dei casi) presenti in persone affette da Neurofibromatosi di tipo 1, (NF1), malattia genetica a trasmissione autosomica dominante, completamente penetrante dall'età di 6-7 anni, con proporzione di casi sporadici del 50% e geneticamente omogenea.

Utilizzando i criteri diagnostici internazionali si riesce a porre diagnosi clinica di NF1 nella maggior parte dei casi. La conferma molecolare è resa complessa dalle dimensioni del gene e dalla mancanza di hot spot mutazionali.

I GOC hanno limitata potenzialità di crescita, soprattutto in età adulta e se presenti in persone con NF1. In età infantile nella NF1 i GOC hanno invece una velocità di crescita variabile ed imprevedibile, che può essere molto rapida, potendo interessare le strutture attigue e diventando sintomatici.

Nella presente ricerca sono stati analizzati pazienti di età infantile ed adulta, valutati almeno una volta presso il Centro Neurofibromatosi del Nord Est Italia.

L'accertamento consiste in una valutazione, in tutti i soggetti affetti, anamnestica (di almeno 3 generazioni), clinica, strumentale (ricerca dei noduli Lisch, esame del fundus, acuità visiva e campimetria) e genetica (analisi molecolare per l'identificazione di microdelezioni del gene NF1 mediante FISH o LOH). In alcuni soggetti è stata ricercata la mutazione-malattia ricorrendo ad ulteriori analisi molecolari (SSCP, PTT, sequenziamento del gene). I risultati sono riportati nelle tabelle 1 e 2 (agli atti presso la Segreteria Regionale Sanità e Sociale).

OBIETTIVI CONSEGUITI E RICADUTE PER IL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE

Frequenza del GOC nei soggetti con NF1.

Nel periodo di studio e nel campione considerato è stato riscontrato GOC in 57 soggetti (7%) su un totale di 822 persone con NF1.

La frequenza di GOC per soggetti con NF1 di età inferiore a gli 11 anni è risultata del 8.6% (33/381). Il rapporto M/F del campione con GOC è 26/31 (0.84).

Caratteristiche e procedure diagnostiche.

L'età minima di diagnosi di NF1 è risultata di 6 mesi e la massima di 40 anni, con età media di 6.5 anni.

Nel 5.6 % (45/57) dei soggetti il GOC è sintomatico. Se sintomatico il GOC è stato sospettato in base alla valutazione oculistica (in gran parte dei casi era presente pallore papillare) in 41/47 soggetti.

In 8 persone, di cui 6 di età inferiore a 4 anni, il GOC era invece asintomatico ed è stato identificato casualmente con l'esecuzione di RM cerebrale di routine.

Decorso e trattamento

Il GOC era monolaterale in 21, bilaterale in 3 ed interessava il chiasma nei restanti 33 soggetti.

Tre soggetti sono deceduti, due in età pediatrica, in conseguenza della patologia tumorale, ed uno in età adulta per neoplasia maligna in altra sede.

In 20 soggetti è stato necessario ricorrere a terapia del GOC, radiante in buona parte dei casi anche in età infantile.

Fattori di rischio genetico

Il GOC è stato osservato in una proporzione significativamente elevata di soggetti con NF1 de novo rispetto ai casi familiari (17/32).

In 39 soggetti con NF1 e GOC è stata ricercata la mutazione del gene NF1: in nessuno di essi è stata rilevata un'ampia delezione del gene NF1.

In 7 soggetti è stata identificata una mutazione, in 5 tale mutazione determina una proteina più corta. Tutte le mutazioni osservate coinvolgono differenti esoni.

L'analisi molecolare dei restanti soggetti è ancora in corso o è risultata negativa quando l'analisi molecolare è stata limitata alla ricerca di ampie delezioni del gene NF1.

Si conferma l'opportunità di un protocollo di diagnosi e di un protocollo assistenziale di controllo, da applicare periodicamente per l'identificazione dei GOC.

Protocollo di diagnosi:

- raccolta dell'anamnesi familiare e personale,
- obiettività,
- accertamenti: (valutazione oculistica completa con es. con lampada a fessura per ricerca noduli Lisch, es. fundus e, quando possibile, acuità visiva e campimetria; analisi genetica molecolare con FISH)
- consulenza genetica.

Protocollo di follow-up (annuale sino all'adolescenza):

- raccordo anamnestico
- obiettività
- valutazione oculistica.