

## Istituto Superiori di Sanità

### INTRODUZIONE

La legge istitutiva del Servizio Sanitario Nazionale (23 dicembre 1978, n. 833) indica in maniera articolata i compiti degli organismi tecnico-scientifici dell'Amministrazione Sanitaria Centrale, come l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPSP), i quali devono assicurare funzioni di controllo, consulenza e ricerca in stretto rapporto con le esigenze del Servizio Sanitario Nazionale (SSN).

Quale organo tecnico-scientifico del SSN, l'ISS è tenuto a fornire opera di consulenza per buona parte delle materie di competenza dello Stato in tema di interventi sanitari.

Elencati dettagliatamente dall'art. 6 della legge e richiamati dall'art. 9, tali interventi riguardano, per la parte di competenza dello ISS: la profilassi e l'assistenza sanitaria anche sotto l'aspetto dei rapporti internazionali; la profilassi delle malattie infettive e gli interventi nei confronti delle epidemie epizootiche; i farmaci, i vaccini e i presidi terapeutici per uso umano e veterinario; le sostanze stupefacenti; i dietetici e gli alimenti per l'infanzia; il controllo degli alimenti e i contenitori degli alimenti; le forme di produzione di energia capaci di alterare l'equilibrio biologico ed ecologico; i trapianti d'organo; l'individuazione delle malattie infettive e diffuse del bestiame e i relativi interventi; l'impiego di principi attivi e di additivi nei prodotti per l'alimentazione zootecnica. L'articolo 9 della stessa legge precisa che, sulla base dei programmi elaborati dal Consiglio Sanitario Nazionale e approvati dal Ministro per la Sanità, l'Istituto organizza corsi di specializzazione e di aggiornamento per operatori sanitari, appronta e aggiorna l'Inventario nazionale delle sostanze chimiche e predi-

sponde i propri programmi di ricerca. Per tale attività di ricerca l'ISS può avvalersi di altre istituzioni pubbliche o private a carattere scientifico. Ciò comporta compiti di valutazione e di coordinamento rispetto a quei contributi di varie parti i quali si richiamano alle priorità sancite nel Piano Sanitario Nazionale e debbono essere confrontati e armonizzati nelle sedi collegiali di valutazione come il Consiglio Sanitario Nazionale e gli organi di consulenza e di controllo previsti per ogni specifica sede.

I notevoli ampliamenti e modifiche delle competenze rispetto a quanto previsto dalle normative precedenti - in particolare la legge "Modifiche ai compiti e alle strutture dell'ISS" (7 agosto 1973, n. 519) e i relativi regolamenti applicativi - hanno già portato a un provvedimento di aumento degli organici dell'ISS nel quadro dei provvedimenti legislativi in attuazione della riforma sanitaria (art. 24, primo comma della legge 29 febbraio 1980, n. 33; decreto ministeriale 26 marzo 1980). Sarà indispensabile nel corso del 1981 provvedere ad una nuova razionalizzazione delle strutture ed alla ridefinizione dei loro compiti per poter far fronte al più presto alle pressanti esigenze della sanità nazionale.

La presente relazione offre una panoramica sintetica della vasta attività scientifica dell'Istituto Superiore di Sanità e, pur senza inutili complacimenti, si deve riconoscere che esso nel 1980 ha svolto, operando al meglio delle sue attuali possibilità, una intensa attività sanitaria di ricerca, di consulenza, di controllo e d'intervento, assolvendo ai compiti affidatigli dalla legge e alle linee programmatiche quali definite nella relazione sull'attività svolta nel 1979. Permane tuttavia una situazione di obiettive difficoltà dovuta all'incremento complessivo dei costi di gestione, e aggravata dai tagli che sono stati recentemente apportati alla spesa pubblica. Non è possibile pensare che l'attività di ricerca possa essere portata avanti se non vengono messi a disposizione mezzi adeguati: basti pensare alla grave carenza di fondi da destinarsi ai materiali di consumo o quella che impedisce la partecip-

zione di gran parte dei ricercatori a congressi e riunioni di rilevanza nazionale e internazionale, che rappresentano l'unica strada percorribile per il necessario continuo aggiornamento del personale tecnico-scientifico.

## SINTESI DELL'ATTIVITA' DELL'ISS NEL 1980

Un quadro riassuntivo delle attività di ricerca dell'ISS nel 1980 è contenuto nella sezione I di questa relazione. Una buona indicazione dell'impegno e della produttività dell'ISS nel settore della ricerca è fornita dalle 267 pubblicazioni apparse nel 1980, di cui un numero notevole su riviste internazionali da 89 rapporti e da 276 comunicazioni a congressi.

Gran parte delle ricerche sono state svolte in collaborazione con Istituti universitari, il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) ed altri enti di ricerca. Trentaquattro sono le convenzioni di ricerca in corso al 1980 contro le venticinque del 1979 (14 con il CNR, 9 con le Comunità Europee (CEE), 4 con l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e 7 con altri enti.

Ciò dimostra l'interesse della comunità scientifica nazionale, comunitaria e internazionale a stabilire forme di collaborazione con i ricercatori dell'ISS. Nel corso dell'anno sono stati organizzati ed ospitati 28 convegni e dibattiti scientifici, 20 corsi (contro gli 8 del 1979) per particolari categorie di personale destinate alla tutela della salute pubblica nei suoi diversi settori e 72 seminari di specialisti italiani e stranieri. Risulta evidente che l'ISS, pur continuando la sua tradizionale attività didattica, l'ha nel corso del 1980 notevolmente potenziata nel rispetto del terzo comma dell'art. 9 della legge 833/1978 che impegna l'Istituto in tale settore. La formazione e l'aggiornamento del personale interno sono stati effettuati anche tramite la partecipazione a corsi presso altre istituzioni.

Inoltre, 63 seminari sono stati tenuti da ricercatori dell'ISS presso altre istituzioni. . Nell'ottica della collaborazione con l'Università e della necessità di addestrare i giovani alla ricerca sono state svolte 61 tesi di laurea, alcune delle quali sono state concluse nel corso dell'anno. Oltre agli studenti universitari,

è stata data ospitalità a docenti che collaborano a ricerche di comune interesse, ad operatori sanitari e tecnici per l'aggiornamento su tecniche specializzate, a ricercatori italiani o stranieri con borse di studio di altri organismi (CNR, Ministero degli Affari Esteri, ecc.) per un totale di 234 persone. L'Istituto ha assegnato nel 1980 cinquantacinque borse di studio : 37 a cittadini italiani provvisti di laurea, 10 a cittadini italiani provvisti di titolo di studio di secondo grado in materie scientifiche o tecniche, 5 a cittadini italiani che seguono corsi di studio universitari nelle stesse materie e 3 a cittadini stranieri provvisti di laurea o diploma finale di abilitazione professionale. E' doveroso sottolineare al riguardo la necessità di rivedere la legge 6 dicembre 1964, n. 1332 e successive modifiche perché l'iter per l'assegnazione delle borse, comportando un notevole lavoro di carattere amministrativo e scientifico, limita la durata del godimento delle borse stesse al secondo semestre dell'anno e il loro ammontare risulta completamente inadeguato rispetto al costo della vita. Va inoltre considerato nel quadro della politica sull'occupazione giovanile la necessità che i borsisti dell'Istituto abbiano uno sbocco professionale specie nelle strutture di sanità pubblica, cosicché la specializzazione conseguita con il godimento delle borse di studio, non resti un fatto puramente intellettuale e personale del borsista, ma si traduca, come deve essere, in un utile investimento sociale.

Per la raccolta e la diffusione delle informazioni tecnico-scientifiche occorrenti alle proprie attività e a quelle degli altri Enti interessati, l'ISS si avvale di validi sistemi informativi. L'interrogazione di singole basi (MEDLINE, RTECS, CANCERLIT, CANCERPROJ, BIOETHICS, HEALTH P.) tramite la National Library of Medicine di Bethesda, Md., USA, offre uno straordinario strumento di ricerca bibliografica sia per il personale dell'Istituto che per la comunità scientifica. Pubbliche amministrazioni e istituti privati di riconosciuto valore scientifico sono stati ammessi con il DM 21 gennaio 1980 (G.U. n. 55 del 26 febbraio 1980) ad utilizzare il sistema MEDLARS (11 università, 4 enti di ricerca, 3 enti ospedalieri e 1 consorzio socio-sanitario). Per quanto riguarda l'u-

tenza, i ricercatori dell'Istituto hanno presentato 724 richieste di ricerche bibliografiche contro 309 pervenute dall'esterno. Nell'utenza esterna le maggiori richieste sono pervenute nell'ordine da università, cliniche universitarie e istituti di ricerca. Le richieste sono giunte da varie parti d'Italia (Bologna, Genova, Napoli, Pordenone, ecc.) e non solo da Roma, quantunque queste siano state relativamente le più numerose.

Nel settore malattie, l'attività di controllo svolta dall'ISS ha riguardato tutti i controlli di Stato dei vaccini batterici e virali impiegati nelle vaccinazioni obbligatorie, raccomandate o facoltative; le immunoglobine normali e specifiche; i sieri animali antitossici per uso umano; i derivati del sangue; i vaccini batterici e virali per uso veterinario. Molto intensa è stata anche l'attività di consulenza e controlli ispettivi riguardo agli Istituti vaccinogeni e sieroterapici, ai Centri trasfusionali ed ai Centri di trapianti di organo.

L'Istituto ha inoltre svolto un'attività diagnostica e di tipizzazione in numerosi casi di malattie di difficile caratterizzazione. Esso è infatti sede di diversi centri di riferimento e provvede al mantenimento di collezioni di diversi microorganismi di interesse sanitario e di linee cellulari. Nel complesso il numero totale di controlli svolti nel settore malattie è di 4.698, mentre 23 sono state le ispezioni ad Istituti da abilitarsi a prelievi e trapianti di parti di cadavere a scopo terapeutico.

Nel settore farmaci, l'Istituto controlla le preparazioni farmaceutiche e cosmetiche in relazione alla loro composizione. Il numero totale dei controlli in tale settore è stato per il 1980 di 1.343. Inoltre, l'ISS svolge un'attività di controllo dei prodotti di nuova istituzione (art. 1, lettera elle, legge 519/1973), che comporta, oltre all'accertamento della composizione quali-quantitativa del preparato, anche quello dell'innocuità. Dal 13 ottobre 1977 (data del decreto ministeriale che ha istituito la Commissione incaricata degli accertamenti dei requisiti dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione) al 31 dicembre 1980 l'Istituto ha esaminato 100 prodotti su 117 pervenuti per competenza, di cui 72

hanno avuto parere favorevole, 28 sfavorevole e 10 con parere interlocutorio. Soltanto sette sono in corso d'esame.

L'attività di controllo che l'Istituto svolge nel settore alimenti riguarda la revisione di analisi chimiche, microbiologiche e bromotologiche. Inoltre, sono state effettuate anche analisi preventive ai fini della registrazione di prodotti dietetici, e di campioni inviati dalla Autorità sanitaria centrale e periferica. Il numero complessivo di tali controlli è stato per il 1980 di 2.586.

Nel settore ambiente sono stati effettuati numerosi interventi di carattere sanitario con relative indagini analitiche, chimiche e microbiologiche per un totale di 7.932 controlli.

Per quanto concerne l'elaborazione di norme tecniche, l'attività in seno a commissioni e a gruppi di studio è stata anche nel 1980 molto intensa schematizzando il tipo di partecipazione: in alcuni casi si tratta di commissioni di lavoro o di studio a carattere scientifico (Comitati scientifici di Istituti vari, Comitato Ricerca Medica delle Comunità Europee, vari gruppi di studio dell'OMS, Commissioni dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), ecc); in altri, a carattere più finalizzato.

Per quanto riguarda l'attività editoriale, accanto alla pubblicazione di articoli tramite i canali tradizionali (periodici, monografie) è stata notevolmente incrementata la pubblicazione di rapporti tecnici e scientifici o note preliminari, stampati direttamente dall'Istituto con il sistema offset, al fine di diffondere rapidamente, ai diversi livelli di informazione, risultati che si abbia interesse a far circolare immediatamente.

## ATTIVITA' DI RICERCA

## 1. SETTORE MALATTIE

L'attività di ricerca svolta nel settore Malattie è stata finalizzata verso gli obiettivi fissati dalla legge istitutiva del Servizio Sanitario Nazionale n. 833/1978.

I laboratori che hanno prevalentemente contribuito alle ricerche in questo settore sono il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, il Laboratorio di Biologia cellulare e Immunologia, il Laboratorio di Malattie batteriche e virali, il laboratorio di Patologia non infettiva, il Laboratorio di Parassitologia, il Laboratorio di Veterinaria, il Laboratorio di Tecnologie biomediche e il Servizio biologico.

Le ricerche effettuate possono essere inquadrare in quattro grandi aree:

- A) ricerche di epidemiologia;
- B) ricerche nel campo delle malattie infettive batteriche, virali, parassitarie e nel campo della sanità veterinaria;
- C) ricerche nel campo delle malattie non infettive;
- D) ricerche nel campo dell'ingegneria biomedica.

## 1.A. RICERCHE DI EPIDEMIOLOGIA

Le ricerche di epidemiologia, svolte nel 1980, hanno riguardato i seguenti settori:

1. Prevenzione primaria delle cardiopatie.
2. Controllo comunitario delle malattie croniche.
3. Epidemiologia del melanoma.
4. Epidemiologia del morbillo.
5. Sorveglianza comunitaria della popolazione contro il rischio di saturnismo.
6. Controllo di qualità (valori di riferimento).
7. Indagine multicentrica sullo stato immunitario della popolazione italiana rispetto alla poliomelite - Controllo sierologico della profilassi vaccinale.
8. Sorveglianza epidemiologica per malattie infettive e per episodi di esposizione a rischio.

### 1.A.1. Prevenzione primaria delle cardiopatie

a) Seven Countries Study. E' uno studio internazionale di tipo osservazionale sulla epidemiologia della cardiopatia coronarica. E' in corso dal 1958 e l'Istituto vi è stato inserito nel 1973. Si propone di studiare i fattori di rischio della cardiopatia coronarica e di altre condizioni croniche in campioni di popolazione seguiti longitudinalmente.

Nel 1980 è stato eseguito il riesame, alla scadenza del 20° anno di follow-up, delle popolazioni rurali di Crevalcore (Emilia) (n = 993) e di Montegiorgio (Marche) (n = 719), con le seguenti attività:

a) Aggiornamento della situazione anagrafica delle due popolazioni in studio.

b) Attribuzione delle cause di morte ai decessi verificatisi tra il 1975 e il 1980. Tale procedura è stata realizzata, per 53 casi a Montegiorgio e per 99 casi a Crevalcore. Si fa presente che con l'avanzare dell'età (attualmente i soggetti sopravvissuti hanno un'età compresa tra i 60 e i 79 anni), l'attribuzione della causa di morte è assai più complessa che in passato e richiede accertamenti più approfonditi che per soggetti più giovani. Inoltre il protocollo della ricerca prevede che non venga accettata la causa di morte del certificato ufficiale, ma che vengano eseguite indagini presso le più varie fonti di informazione per redigere una causa secondo criteri precedentemente determinati.

c) Messa a punto del questionario sul consumo di acqua potabile e sulle sue caratteristiche allo scopo di stabilire le fonti di acqua potabile impiegate negli ultimi 30 anni.

d) Esame diretto dei sopravvissuti.

e) Raccolta di campioni di acque potabili nelle due aree per la determinazione della durezza e della concentrazione di vari ioni presenti nei diversi tipi e qualità delle acque.

Sono stati raccolti e codificati i dati sulla mortalità e sulle cause di morte relativi alla terza popolazione italiana studiata nell'ambito del Seven Countries Study (ferrovieri di Roma, n = 768) che così è stata seguita complessivamente per 15 anni. I relativi dati sono in corso di analisi.

Tramite la collaborazione internazionale con il Laboratory of Physiological Hygiene, University of Minnesota, Minneapolis, USA e le altre istituzioni coinvolte nel Seven Countries Study, sono stati acquisiti, classificati e codificati i dati di mortalità e le cause di

morte relativi a tutte le 16 aree internazionali del Seven Countries Study alla scadenza dei 15 anni di follow-up. I dati sono ora pronti per la analisi finale

E' stato recentemente pubblicato il "Manuale del Rischio Coronarico per stimare il rischio coronarico nella pratica medica." Esso consiste in un semplice sistema di tabelle che permettono, al tavolo di ogni medico e sulla base di poche informazioni (età, livello di attività fisica, consumo di sigarette, pressione sistolica e colesterolemia, più eventualmente elettrocardiogramma se disponibile), di stimare le probabilità che una persona, esente da manifestazioni cliniche di cardiopatia coronarica, vada incontro ad un grave evento coronarico entro 10 anni. I dati derivano dall'esperienza maturata in 10 anni nelle aree italiane del Seven Countries Study. Il Manuale è in corso di distribuzione al maggior numero possibile di istituzioni sanitarie e di medici italiani perchè assuma il ruolo di uno strumento utile nella pratica quotidiana.

b) Progetto romano di prevenzione della cardiopatia coronarica. E' un esperimento controllato di prevenzione primaria della cardiopatia coronarica iniziato nel 1973, cui l'Istituto ha sempre partecipato. Si svolge a Roma su oltre 6.000 soggetti e rappresenta la sezione italiana del WHO European Multifactor Preventive Trial of CHD, cui partecipano centri di 5 paesi europei sotto il coordinamento dell'OMS, Ufficio Regionale per l'Europa.

c) Fattori di rischio. (Linea di Ricerca RF2 del Subprogetto Aterosclerosi del Progetto Finalizzato di Medicina Preventiva del CNR, (ATS-RF2)).

Il Progetto RF2 si propone: (a) di descrivere la distribuzione di alcuni classici fattori di rischio dell'aterosclerosi in 9 campioni di popolazione italiana e (b) di mettere a punto tecniche valide per la modificazione di tali fattori da applicare sulle stesse popolazioni. L'unità operativa di Roma-2, presso questo Istituto, ha compiti di coordinamento, programmazione ed analisi.

Nel corso del 1980 é stata completata l'analisi della cosiddetta fase A che si prefiggeva di descrivere la distribuzione di alcuni fattori di rischio dell'aterosclerosi in 9 campioni di popolazione italiana (Venezia-Marghera, Mirano (VE), Stradella (PV), Bologna-Murri, Sovicille (SI), Roma-Tuscolano, Mugnano (NA), Sinnai (CA), Trabia (PA), in 8 regioni, sui quali hanno lavorato le altre 9 Unità Operative della Linea di Ricerca RF2. I risultati di questa indagine sono in corso di pubblicazione.

#### 1.A.2. Controllo comunitario delle malattie croniche.

Si tratta di un nuovo programma le cui prime idee sono state sviluppate solo nel 1979. Esso si prefigge di realizzare la prevenzione primaria di alcune malattie croniche, con l'obiettivo di ridurre l'incidenza e la mortalità, attraverso azioni dirette a modificare i valori medi e la distribuzione di un certo numero di fattori di rischio, in vari gruppi di popolazione, mettendo a punto modelli di intervento comunitario ben riproducibili e di costi non eccessivi.

Uno studio pilota di "Controllo Comunitario dell'Ipertensione Arteriosa" è stato condotto a Montevarchi (AR) prendendo spunto da una richiesta di consulenza pervenuta dal locale ente ospedaliero. Sono state trasferite,

per essere applicate localmente, le procedure di screening, registrazione e trattamento comunitario dell'ipertensione arteriosa già sperimentate dal Progetto Romano della Cardiopatia Coronarica e del Progetto Aterosclerosi RF2 del CNR. I dati relativi ai primi sei mesi di attività sono in corso di analisi.

### 1.A.3. Epidemiologia del melanoma.

Gli obiettivi del programma riguardano: l'analisi della mortalità in Italia; la valutazione dell'associazione fra esposizione al sole e incidenza del melanoma; la misura dell'incidenza del melanoma nella città di Roma; la valutazione della sopravvivenza; la verifica di alcune ipotesi eziologiche.

In Italia gli unici dati, sino ad oggi disponibili, di mortalità del melanoma sono le denunce di morte pubblicate dall'Istat. E' stata studiata quindi la mortalità in Italia per melanoma maligno della pelle e per tumore in tutti i siti anatomici dal 1955, anno in cui è iniziata la pubblicazione dell'Annuario di Statistiche Sanitarie, al 1975. Dall'analisi è risultato che, nel periodo preso in esame, entrambe le mortalità sono aumentate, ma mentre quella per tumore è aumentata del 24% circa, la mortalità per melanoma è pressoché triplicata (da 0,25 a 0,85 per 100.000 abitanti).

Lo studio della distribuzione geografica del melanoma è stato limitato ai continenti con prevalenza di popolazione bianca, in quanto questa ha un rischio maggiore di contrarre tale malattia, e per i quali fossero pubblicati i valori di incidenza nel volume "Cancer Incidence in

Five Continents" (IARC). La maggior parte dei dati deriva quindi da Europa e Nord America. In questi continenti l'incidenza del melanoma è stata analizzata in relazione alla latitudine in cui vive la popolazione. Ciò è stato fatto per evidenziare una possibile correlazione fra incidenza ed esposizione solare, correlazione postulata da molti autori.

#### 1.A.4. Epidemiologia del morbillo.

La ricerca si articola in:

a) Un'indagine sieroepidemiologica sullo stato immunitario della popolazione italiana rispetto al morbillo. Si è concluso il controllo di qualità interlaboratorio relativo alle analisi sierologiche condotte con il test HI. I risultati mostrano per tutti i centri collaboranti un buon livello di concordanza.

b) Uno studio retrospettivo sui ricoveri ospedalieri, dal 1968 al 1978, in un ospedale pediatrico romano. E' stata condotta una prima analisi sulle schede, e i primi risultati possono essere così riassunti: si sono avuti circa 104 ricoveri l'anno in media e sempre mediamente ogni anno 14 sono i casi con infezione contratta in ospedale; l'età e la degenza media variano in un range di 2.7 - 4.9 anni e di 15.4 - 20.0 giorni, rispettivamente. Per avere un raffronto negli OO.RR. di Roma si sono avuti negli anni per cui sono disponibili statistiche circa 200 ricoveri l'anno con età media variante tra i 4 e i 6 anni. Le forme complicate più gravi rappresentano in media oltre il 30% dei ricoveri e tra queste quelle riguardanti l'apparato respiratorio sono circa l'80% e quelle riguardanti il sistema nervoso circa il 7%.

c) Una programmazione ed esecuzione di una campagna di vaccinazione antimorbillosa controllata in sede locale. Tale ricerca ha lo scopo di verificare i problemi operativi ed organizzativi, gli strumenti e le strutture logistiche, cioè la capacità di strutture di sanità pubblica territoriali a livello di distretto di introdurre una nuova profilassi vaccinale di massa e di verificare la risposta della popolazione.

1.A.5. Sorveglianza comunitaria della popolazione contro il rischio di saturnismo.

L'Istituto ha coordinato in questo ambito un'indagine (parallela ad altre simili condotte contemporaneamente nei restanti paesi della CEE) che rappresenta la prima fase di un programma per l'attuazione della direttiva del Consiglio delle Comunità Europee del 29 marzo 1977. L'indagine è stata condotta in otto zone (Venezia, Milano, Paderno, Sassuolo, Bologna, Roma, Torino, Napoli), durante l'estate del 1979. Sono stati esaminati 2558 soggetti (1970 adulti e 588 bambini). Ad ogni soggetto è stato sottoposto un questionario, comune a tutti i paesi partecipanti all'indagine, ed effettuato un prelievo di sangue venoso per la esecuzione della piombemia.

I soggetti sono stati divisi in "non esposti" ed "esposti" a rischio di saturnismo in base all'attività svolta e ad eventuale sorveglianza medica specifica, al fine di ottenere dati più rappresentativi della popolazione generale. In alcune zone (Paderno, Sassuolo, Bologna, Torino) anche nei non esposti si osservano superamenti dei livelli comunitari.

Il complesso dei risultati ottenuti nel nostro Paese in questa prima fa-

se dell'indagine comunitaria sembra indicare la necessità di predisporre in tempi brevi misure specifiche per l'identificazione e il controllo delle maggiori fonti di inquinamento ambientale da piombo. E' comunque prevista una seconda fase dell'indagine estesa a un più ampio campione di popolazione in cui inserire indagini specifiche per valutare il rischio specifico e il rischio probabile.

1.A.6. Controllo di qualità (Valori di riferimento).

Si è completato lo studio critico dei modelli di controllo di qualità, mettendo a punto un nuovo schema per il controllo dell'errore tra dosaggi nel laboratorio e tra laboratori diversi. Tale schema, sviluppato per la valutazione radioimmunologica dell'attività reninica plasmatica, è stato controllato anche per altre sostanze (insulina, HGH, ecc.) e si è dimostrato versatile e rispondente ai requisiti richiesti.

E' stato, peraltro, controllato un sistema di qualità globale, messo precedentemente a punto, per l'analisi di  $T_3$  e TSH nella sorveglianza delle tireopatie neonatali. Dati ricavati con tale schema di controllo sono stati utilizzati nello studio della funzione tiroidea neonatale. Nell'ambito di questo programma sono stati anche studiati i profili amminoacidici di 630 soggetti "normali" (di età sino a 15 anni) relativi a 24 amminoacidi.

**1.A.7. Indagine multicentrica sullo stato immunitario della popolazione italiana rispetto alla poliomielite - controllo sieroepidemiologico della profilassi vaccinale.**

Tale programma intende verificare, anche in accordo con le raccomandazioni dell'OMS alle Autorità sanitarie nazionali, lo stato immunitario della popolazione italiana rispetto alle infezioni da poliovirus vaccinale e non, dopo oltre 15 anni dall'introduzione della vaccinazione con vaccino vivo attenuato. Scopo di tale lavoro è di verificare, dallo stato immunitario, l'andamento della vaccinazione in Italia, così che sia possibile potenziare la pratica vaccinale e programmare indagini mirate nelle situazioni che possono presentare difetti nella esecuzione della profilassi. E' stato definito il campionamento, stratificato per età, per area geografica e per condizione socio-economica, è stata elaborata la scheda di corredo dei sieri, sono stati selezionati i ceppi virali e definite le tecniche di analisi sierologica in accordo con i Centri collaboranti.

**1.A.8. Sorveglianza epidemiologica per le malattie infettive e per episodi di esposizione a rischio.**

Nel corso del 1980 è stata svolta un'intensa attività di consulenza e di controllo nei seguenti settori:

- a) sorveglianza epidemiologica delle malattie infettive;
- b) sistema di sorveglianza per le zone colpite dal sisma del 23 novembre 1980;
- c) infezioni ospedaliere;

- d) epidemiologia della lebbra;
- e) epidemiologia delle infezioni da salmonellosi;
- f) epidemiologia delle infezioni pneumococciche in Italia;
- g) indagine epidemiologica sui casi di leucemia acuta infantile della provincia di Sassari;
- h) malformazioni congenite nella zona di Augusta;

a) Sorveglianza epidemiologica delle malattie infettive. Nel 1980 sono stati affrontati i problemi connessi con l'applicazione della sorveglianza epidemiologica nel settore delle malattie infettive utilizzando i nuovi strumenti previsti dal Servizio Sanitario Nazionale che sono tuttora in fase di attuazione. Uno dei primi strumenti individuati è un bollettino epidemiologico che permetta una rapida diffusione e valutazione dei dati di interesse nazionale. Le Regioni, quali organizzazioni afferenti al bollettino, saranno quindi in diretto contatto con le istituzioni centrali e tra di loro. In particolare si è puntato al miglioramento qualitativo e quantitativo dell'informazione riguardante le malattie trasmissibili.

La prima difficoltà per gli organi centrali e per le regioni è l'attuale sistema di notifiche per le malattie infettive che essendo passato dalla responsabilità dell'ufficiale sanitario e del medico provinciale alle Unità Sanitarie Locali, incontrano notevoli problemi nello essere mantenuto in funzionamento. Se è vero che la qualità dei dati è dipendente dall'accuratezza degli operatori sanitari periferici che li raccolgono, è anche vero che un rapido ritorno dell'informazione dal centro alla periferia stimola l'interesse e l'attenzione di questi ultimi influenzando quindi la qualità del loro operato.

Un'azione di consulenza e formazione è stata esplicata durante i continui interventi di campo effettuati su richiesta delle regioni. In tali occasioni è difficile scindere la ricerca epidemiologica dall'atti-

vità di consulenza e di contributo allo sviluppo professionale degli operatori sanitari periferici. Vengono di seguito elencati gli interventi sul campo eseguiti su richiesta delle regioni:

- Continuazione della sorveglianza per l'inquinamento ambientale microbiologico nell'area di Cagliari dove nel 1979 si erano verificati 12 casi di infezione da Vibrio cholera 0-1 , e dall'indagine retrospettiva sui ricoveri negli ultimi 10 anni presso gli ospedali di Cagliari per malattie gastroenteriche.

- Intervento su un'epidemia di febbre tifoide ad Isernia e provincia. Indagine caso-controllo per l'evidenziazione di eventuali fattori di rischio.

- Intervento su un'epidemia di brucellosi nella zona endemica di Isernia e provincia. Studio-caso-controllo per la ricerca di eventuali fattori di rischio.

- Intervento su un'epidemia di gastroenterite in un asilo nido di Roma. Studio di coorte e sorveglianza umana e ambientale per 3 mesi. Isolamento di numerosi stipti Yersinia enterocolitica.

- Intervento su epidemia di gastroenterite a Vicenza, connessa al consumo di frutti di mare. Isolamento di numerosi stipti di vibrioni non agglutinabili (NAG).

- Intervento su un gruppo di casi di infezione da Legionella pneumophila avvenuti a Lido del Savio (RA) nel periodo luglio-settembre 1980. Indagini di coorte per la ricerca dei fattori di rischio.

- Intervento su un'epidemia di epatite virale A verificatasi a Campobasso in una scuola. Studio caso-controllo e individuazione della fonte contaminante.

b) Sistema di sorveglianza per le zone colpite dal sisma del 23.11.1980. E' già ampiamente documentata dalla letteratura la necessità di un'informazione corretta nella gestione sanitaria post-terremoto. La

Organizzazione Mondiale della Sanità ha recentemente raccolto queste esperienze in un manuale-guida sulla gestione dei problemi sanitari dopo disastri naturali. Anche nel sisma italiano del novembre 1980 si sono ripetuti i problemi già studiati in molte altre occasioni; in particolare la assenza di un sistema informativo attendibile e rapidamente disponibile. Le tecniche della sorveglianza epidemiologica sono state con successo applicate in altri disastri naturali; è quindi stato naturale suggerirne lo utilizzo anche nel recente sisma.

La sorveglianza epidemiologica è stata attuata in 3 settori:

1. Monitoraggio della morbosità.
2. Rilevazione dei bisogni sanitari.
3. Rilevazione dei rischi di morbosità e mortalità da trauma sismico attraverso gli studi epidemiologici.

Obiettivi della sorveglianza sono stati:

1. Fornire in modo rapido e costante informazioni sulla morbosità utili all'intervento.
2. Indagare tempestivamente "voci" epidemiche di ogni tipo ed eventualmente attivare indagini epidemiologiche di campo.
3. Fornire in modo rapido informazioni standardizzate sulla morbosità nell'area terremotata.
4. Attivare studi epidemiologici di campo per evidenziare rischi di morbosità e mortalità sismica, utili alla programmazione di interventi preventivi di altri disastri naturali.

E' stato costituito un Osservatorio Epidemiologico Nazionale per le aree terremotate a cui pervenivano, ogni giorno, informazioni sui ricoveri ospedalieri nelle ultime 24 ore dai 52 ospedali, civili e da campo, presenti nell'area. Le informazioni raccolte telefonicamente su omogeneo supporto informativo venivano immesse nel calcolatore ed ogni giorno, alle ore 13, veniva rilasciato un bollettino riassuntivo della morbosità nell'area terremotata. Tale bollettino veniva teletrasmesso al Ministero della Sanità ed alle autorità locali, regionali e provinciali.

Ogni 7 giorni un riepilogo dei dati, insieme ad informazioni epidemiologiche affini, veniva pubblicato sul Bollettino Epidemiologico Nazionale inviato per vie postali a tutti gli operatori sanitari della zona. In collaborazione con le autorità locali, sono stati approntati gruppi di intervento sul campo disponibili in continuo ed attivabili sia da segnalazioni dell'Osservatorio che dalle stesse Autorità locali.

Risultati. Numerose sono state le "voci epidemiche" su cui si è intervenuto, mentre non vi sono state reali variazioni dell'andamento epidemiologico "normale" per le malattie infettive nell'area terremotata: è stato ancora una volta dimostrato che il terremoto non provoca necessariamente terribili epidemie, mentre lo "spettro epidemico" è spesso oggetto di eccessive attenzioni da parte dell'opinione pubblica e qualche volta anche da parte di operatori sanitari non adeguatamente informati. La disponibilità di dati recenti controllati ha permesso di risolvere rapidamente molti "falsi allarmi" evitando interventi inappropriati. Alcune sospette epidemie sono state indagate sul campo avvalendosi della collaborazione delle équipes epidemiologiche locali.

Favorevole accoglienza ha ricevuto il Bollettino Epidemiologico Nazionale, strumento di restituzione rapido dei dati raccolti e di collegamento anche tra gli operatori sanitari delle Regioni non colpite dal disastro.

Ricadute del sistema:

a) A livello centrale. Tre attività rimarranno funzionanti anche dopo la cessazione della sorveglianza delle malattie nelle aree terremotate: 1. Il Bollettino Epidemiologico Nazionale a scadenza settimanale entro il mese di giugno 1981 raggiungerà circa 1000 operatori sanitari, incluse tutte le USL, le Province, le Regioni; per la fine del 1981 è previsto che raggiunga le 5000 copie e contenga, settimanalmente, le malattie trasmissibili notificate con il Sistema Rapido Sperimentale di Notifica in corso di approntamento. 2. Sistema di sorveglianza rapido, con linee telefoniche proprie, terminali telecopier per trasmissione a distanza, terminali con il Centro di Calcolo dell'Istituto che ha esteso

il programma operativo di elaborazione dati e di memoria a tutte le Regioni italiane per il settore delle malattie infettive.

3. Verifiche di flussi informativi e delle procedure di sorveglianza.

b) A livello periferico. L'acquisizione più rilevante dell'esperienza vissuta è senza dubbio da ricercare nella modifica di atteggiamento culturale nei confronti delle "epidemie" che il sistema ha innescato. L'utilizzo dei reali dati epidemiologici per decidere gli interventi è stato per molti un fatto nuovo; l'abbandono di dogmi precostituiti, la possibilità di verificare direttamente l'efficacia degli interventi sono stati fatti reali che hanno avuto un benefico impatto sugli operatori di sanità pubblica. Le strutture epidemiologiche locali (Osservatorio Epidemiologico del Comune di Napoli) hanno fornito un contributo rilevante alla programmazione ed alla valutazione degli interventi. Tale strumento informativo che puntualmente ogni settimana raggiunge gli uffici sanitari regionali e le USL può costituire uno stimolo positivo per innescare un processo di attiva collaborazione anche presso quelle regioni e quelle strutture periferiche non ancora sufficientemente collegate con il sistema informativo nazionale.

c) Infezioni ospedaliere. Questo programma consiste in una indagine trasversale sul controllo delle infezioni ospedaliere allo scopo di conoscere e valutare la sensibilizzazione degli ospedali a questo specifico problema. L'indagine è stata effettuata mediante un questionario inviato a tutti gli ospedali italiani, con domande sulla presenza di programmi di controllo delle infezioni ospedaliere. Lo studio è attualmente in pieno svolgimento; al momento sono stati contattati 900 ospedali e sono state elaborate le risposte di 250.

d) Epidemiologia della lebbra. E' stato intrapreso uno studio

epidemiologico descrittivo sulla situazione della lebbra in Italia, allo scopo di formulare un programma specifico di eradicazione.

E' stata eseguita un'indagine retrospettiva sui dati ISTAT dal 1945 al 1979, ed è stato compilato un elenco di tutti i casi registrati presso il Ministero della Sanità dal 1903. I dati raccolti per ogni caso sono stati codificati ed elaborati per individuare le maggiori caratteristiche descrittive. Al momento lo studio descrittivo è terminato ed è in via di formulazione il progetto sull'eradicazione.

e) Epidemiologia delle infezioni da salmonelle in Italia. Una scheda nazionale viene compilata per ogni ceppo di salmonelle di origine umana, animale, ambientale, isolata e riferita ai 15 centri regionali di tipizzazione enterobatteri. Le schede vengono codificate e memorizzate nel calcolatore: l'elaborazione trimestrale permette la stesura di un rapporto periodico su tali infezioni.

f) Epidemiologia delle infezioni pneumococciche in Italia. Una indagine trasversale di prevalenza sulle infezioni pneumococciche è stata condotta su 12 centri ospedalieri italiani: da casi di meningiti, otiti e polmoniti sono stati isolati ceppi di pneumococchi inviati successivamente in Istituto con una scheda informativa.

Un'analisi dei dati ha permesso di costruire un quadro sulla prevalenza dell'infezione nel paese in modo da verificare la possibilità di utilizzo dei vaccini oggi esistenti.

g) Indagine epidemiologica sui casi di leucemia acuta infantile della provincia di Sassari. A partire dal dicembre del 1979, in seguito ad un rapporto dell'Istituto "G. Gaslini" di Genova che segnalava un au-

mento di ricoveri di bambini, affetti da leucemia acuta infantile, provenienti dall'area nord-occidentale della Sardegna, fu deciso, da parte dell'Assessorato alla Sanità della Regione, un accertamento sul campo di tutti i casi di leucemia verificatisi nella zona. L'indagine sul campo, oltre ad accertare i casi di leucemia realmente verificatesi nella provincia di Sassari, nel periodo 1974-1979, si riprometteva di individuare le possibili cause di malattia con uno studio retrospettivo caso-controllo. Dai dati raccolti in questo studio, emerge, come ipotesi più probabile, che i casi verificatesi siano da imputare ad una fluttuazione casuale; non sono stati, d'altro canto, evidenziati particolari fattori di rischio specifici.

h) Malformazioni di Augusta. In seguito ad un denunciato aumento di casi di malformazioni congenite nella zona di Augusta, si è provveduto ad analizzare i dati ufficiali di mortalità per tale causa, comparando i dati del Comune con quelli provinciali, regionali e nazionali. Si è preso spunto da questa analisi per progettare un sistema automatico di accesso ai dati ufficiali di mortalità dell'ultimo decennio disponibile.

#### 1.B. RICERCHE NEL CAMPO DELLE MALATTIE INFETTIVE BATTERICHE, VIRALI, PARASSITARIE E NEL CAMPO DELLA SANITA' VETERINARIA.

In questo capitolo sono riportate le ricerche svolte nei seguenti settori:

1. Malattie batteriche
2. Malattie virali

## 3. Malattie parassitarie

## 4. Sanità veterinaria

1.B.1. Malattie batteriche

a) Infezioni enteriche. Nell'ambito di un programma di sorveglianza delle infezioni enteriche di origine batterica e del Centro nazionale di riferimento per gli enterobatteri patogeni, è stato portato a termine uno studio di confronto fra stipiti di vibrioni colerici isolati nelle epidemie del 1973 e 1979 e da casi sporadici importati; non sono state dimostrate differenze sostanziali tra i vari ceppi. La sorveglianza di casi di gastroenterite da Vibro cholerae non 01 (NAG) ha portato ad evidenziare una epidemia che ha interessato un gruppo di militari della base NATO di Vicenza. L'indagine epidemiologica ha evidenziato come causa dell'infezione la ingestione di ostriche crude.

b) Infezioni respiratorie. Nell'ambito di un programma di sorveglianza delle infezioni respiratorie di origine batterica, è iniziato uno studio sulla patologia da streptococco di gruppo B (S. agalactiae), dimostrato, in altri paesi, responsabile di sindromi respiratorie, settiche e meningee neonatali. Si sono osservate 300 coppie madre-bambino per verificare la presenza di questo streptococco fra i vari microrganismi che compongono la flora vaginale in gravidanza e la differente percentuale di colonizzazione nei bambini. Per tale scopo sono state messe a punto le metodologie per l'isolamento e l'identificazione di S. agalactiae.

c) Infezioni nosocomiali. In questi ultimi anni si è posto l'accento sull'importanza del ruolo svolto dai batteri anaerobi in molte infezioni umane, in particolare in quelle nosocomiali. Particolare attenzione è stata dedicata nel 1980 da un lato alla analisi e alla messa a punto di metodiche diagnostiche, con particolare riferimento alle prove di fermentazione degli zuccheri, dall'altro a studi atti a rilevare l'incidenza delle infezioni sostenute da questi germi in seguito ad interventi chirurgici e a valutare l'efficacia di una antibiotico-profilassi mirata. Si è dimostrato che in circa il 50% dei casi esaminati di infezioni addominali si mette in evidenza la presenza di batteri anaerobi e aerobi, nel 10% solo di anaerobi e nel 18% solo di aerobi: i Bacteroides sono risultati la specie anaerobia più frequentemente isolata. Si è effettuata inoltre una indagine randomizzata a doppio cieco su pazienti appendicectomizzati per valutare l'efficacia di antibiotici. I risultati ottenuti trattando un gruppo di pazienti con un antibiotico attivo contro i batteri aerobi (Cefalotina) ed un altro trattato con un antibiotico attivo contro aerobi ed anaerobi (Cefoxitin) hanno dimostrato la efficacia di questo secondo trattamento sia nella terapia delle infezioni postchirurgiche sia nella prevenzione delle complicanze setticemiche. Una seconda linea di ricerca ha avuto come oggetto lo studio della diffusione di Stafilococco aureus meticillino-resistente in ambienti ospedalieri ed extraospedalieri. I risultati ottenuti hanno dimostrato la circolazione in ambienti ospedalieri di particolari fagotipi non riscontrabili in altri ambienti. Riguardo alla sensibilità agli antibiotici è importante il fatto che i ceppi non tipizzabili provenienti da alimenti presentavano le stesse resistenze dei ceppi non tipizzabili ospedalieri, in particolar modo resistenze ad antibiotici entrati da poco tempo nell'uso.

d) Leptosirosi. Nell'ambito dell'attività del Centro di Ri-

ferimento Nazionale per le Leptosirosi è stato messo a punto un metodo per la purificazione di un antigene di leptospira che sostituisce, con una specificità ed una sensibilità equivalenti, una batteria di 20 antigeni attualmente impiegati per la diagnosi sierologica di leptosirosi.

e) Legionellosi. Sono stati condotti studi per valutare la incidenza di infezioni da Legionella pneumophila nelle sindromi broncopneumoniche. La ricerca di anticorpi specifici mediante immunofluorescenza indiretta su coppie di sieri di malati con quadro radiologico di infiltrati polmonari ha messo in evidenza sier conversionsi e titoli elevati in 11 coppie di sieri. E' stata individuata un'epidemia di Legionellosi in un gruppo di persone che aveva soggiornato in località Lido di Savio nel settembre '80 per turismo.

f) Tossine proteiche. Sono in corso da alcuni anni studi sui meccanismi molecolari della patogenesi di infezioni da enterobatteri, risultato dell'azione di tossine proteiche. E' noto che l'azione di un gruppo di tossine, sia di origine batterica che vegetale (colerica, difterica, tetanica, ricina, abrina) si esplica attraverso una serie di eventi molecolari, che consistono a) nel legame con recettori specifici sulla superficie cellulare, b) nell'ingresso e/o passaggio attraverso la membrana e c) nell'attivazione o inibizione di attività cellulari. Studi spettroscopici condotti nel 1980 sulla tossina colerica interagente con il ganglioside  $G_{M1}$  hanno dimostrato che la conformazione della tossina non è influenzata dal legame con il proprio recettore di membrana, suggerendo che ciascuna catena polipeptidica della tossina formi un dominio strutturale indipendente. Questo modello è stato verificato studiando la topologia dell'interazione della tossina con membrane liposomiali conte-

menti  $G_{M1}$ . Ulteriori informazioni sull'interazione proteine-recettori gangliosidici sono state ottenute dallo studio di complessi tra siero-albumina bovina e  $G_{M1}$  e dalla caratterizzazione strutturale di membrane modello contenenti gangliosidi. Studi competitivi tra tossine proteiche aventi meccanismi di azione diversi, ma strutturalmente simili, hanno dimostrato che cellule HeLa preincubate con tossina colerica sono più resistenti agli effetti tossici della ricina e dell'abrina e mantengono livelli apprezzabili di sintesi. E' stato infine dimostrato che la tossina colerica inibisce gli effetti dell'interferone nelle cellule leucemiche di Friend.

### 1.B.2. Malattie virali

a) Infezioni respiratorie. Nell'ambito di un programma sulla sorveglianza dell'influenza del Centro nazionale di riferimento per la influenza dell'OMS, è stato effettuato nel 1980 uno studio sulla diffusione e prevalenza dei ceppi di virus influenzali sia a scopo epidemiologico che per la definizione della composizione del vaccino antinfluenzale. Sono stati caratterizzati antigenicamente circa 60 ceppi da isolamenti di virus influenzale pervenuti da tutto il territorio nazionale definendo così il seguente quadro per la stagione in esame: prevalenza della variante  $H_3N_2$ -A/Bangkok/1/79, circolazione contemporanea del sottotipo  $H_1N_1$  ceppo A/Brazil/11/78. La prevalenza e la diffusione di questi virus è stata confermata da una indagine sierologica su circa 700 campioni di siero di soggetti sani. I risultati di questa indagine hanno evidenziato anche la circolazione, pur modesta, di virus influenzale di tipo B. Si è anche studiata la possibilità di impiegare il test immunoenzimati-

co - Elisa - per la determinazione degli anticorpi specifici antinfluenzali di tipo B. I risultati ottenuti hanno confermato la specificità, riproducibilità e sensibilità del metodo. Questa in particolare è risultata 10 volte superiore a quella del test di inibizione della emoagglutinazione normalmente in uso. Un'altra ricerca ha riguardato la messa punto e standardizzazione della tecnica di immunodiffusione radiale singola per il dosaggio del contenuto antigenico dei vaccini antinfluenzali. Sempre nel campo della vaccinazione antinfluenzale, è stato effettuato uno studio sulla risposta anticorpale verso le varianti sottotipiche dei virus influenzali. Tale studio ha confermato la necessità di includere nel vaccino i ceppi epidemici circolanti.

b) Morbillo. Nell'ambito di un programma riguardante la epidemiologia del morbillo in Italia anche in rapporto alla campagna di vaccinazione, è stata ultimata una indagine retrospettiva sulle complicanze da morbillo in soggetti ospedalizzati. I risultati ottenuti, relativi a casi dell'Ospedale Pediatrico "Bambin Gesù" di Roma, hanno evidenziato, in 10 anni, una media di 104 ricoveri all'anno di età compresa fra 2,7 e 4,9 anni, e una degenza media di 15,4-20,0 giorni. Le forme complicate più gravi rappresentano in media oltre il 30% dei ricoveri e tra queste quelle riguardanti l'apparato respiratorio sono circa l'80% e quelle riguardanti il sistema nervoso circa il 7%. Un'altra ricerca ha riguardato la programmazione ed esecuzione di una campagna di vaccinazione antimorbillosa nell'area di Treviso interessante il comune di Paese di circa 15.000 abitanti e 1.650 bambini tra i 15 mesi ed i 7 anni. E' stato effettuato il prelievo di siero per circa il 90% della popolazione infantile indicata e sono risultati negativi circa il 50% dei soggetti. E' stata effettuata la vaccinazione in oltre l'80% dei sieronegativi. Sono stati controllati gli effetti collaterali della vaccinazione ed è stato eseguito uno studio caso-controllo su 120 vaccinati e 120 controlli

sieropositivi.

Un altro filone di ricerca è stato rivolto alla valutazione e standardizzazione di tecniche sierologiche per la determinazione degli anticorpi postvaccinali o conseguenti ad infezione naturale con il virus del morbillo. Sono state prese in considerazione le tecniche di Immunoaderenza (IAHA), Immunoemolisi radiale in gel (SRH) e Immunoenzimatica ELISA. Le tre metodiche si sono rivelate una valida alternativa al test di inibizione dell'emoagglutinazione (IHA), attualmente in uso, specialmente per il rilevamento di anticorpi derivanti da malattia naturale. E' stata messa in evidenza una minore sensibilità rispetto all'IHA delle due tecniche mediate da complemento SRH e IAHA nel rilevamento di anticorpi postvaccinali. Ciò può essere attribuito o alla presenza di aliquote di IgM o ad una minore risposta verso gli antigeni profondi nella vaccinazione rispetto alla malattia naturale.

c) Enteriti infantili di natura virale. Sono stati compiuti studi per la definizione della rilevanza patologica delle infezioni da rotavirus nella insorgenza delle diarree nel bambino e nell'immaturato, con finalità diagnostico-epidemiologiche, anche in relazione alle possibili implicazioni sul piano clinico-terapeutico. Nel 1980 sono state sottoposte ad indagine elettronmicroscopica diverse centinaia di campioni fecali del Reparto Immaturi dell'Ospedale del Bambin Gesù di Roma.

d) Encefaliti erpetiche. Sono stati compiuti studi per la definizione del ruolo dei 2 tipi antigenici di virus Herpes in differenti sindromi neurologiche, anche in relazione a possibili interventi terapeutici. Sui casi esaminati, è stata fatta diagnosi di Herpes simplex di tipo 1 o con l'isolamento virale o mediante evidenziazione di movimento anticorpale specifico nel siero o nel liquido.

e) Infezioni da arbovirus. Nell'ambito di un programma sulla circolazione e biologia di alcuni arbovirus, si è proseguito lo studio ecologico del focolaio del virus dell'encefalite centro-europea (TBE) individuato in Toscana. E' stata confermata l'attività continua del focolaio sia con un ulteriore isolamento virale dagli organi di un micromammifero selvatico catturato all'interno del focolaio stesso sia dalla identificazione di un altro caso clinico. L'isolamento del virus dal micromammifero (Apodemus sylvaticus) insieme ai risultati del controllo sierologico degli animali selvatici catturati nel territorio ha permesso di chiarire il ciclo in natura del virus e cioè fra la zecca Ixodes ricinus, micromammiferi serbatoio e mammiferi selvatici di media taglia (volpi, ricci) con funzioni di disseminazione ed amplificazione del virus in natura. Sierologicamente si è anche dimostrata una più ampia estensione della zona di circolazione del virus TBE fra animali di varie specie e di conseguenza un rischio potenziale per l'uomo.

Un'altra ricerca è stata svolta per la determinazione del possibile ruolo eziologico nelle infezioni acute del sistema nervoso centrale di un arbovirus: il virus Toscana, isolato da flebotomi alcuni anni fa, di cui nel 1980 si è avuta la definitiva registrazione come un nuovo arbovirus nella "International Catalogue of Arboviruses". Si sono individuate zone di elevata concentrazione del vettore e si sono isolati ulteriori ceppi virali correlati antigenicamente al virus Toscana.

Parallelamente sono stati iniziati studi sulla replicazione del virus Toscana in cellule di vertebrato. Si è ottenuto l'instaurarsi di infezioni persistenti in una linea cellulare e la persistenza si è mantenuta per alcuni mesi. Si sono studiati i possibili meccanismi responsabili per l'instaurarsi ed il mantenimento della persistenza. L'interesse crescente per lo studio di infezioni persistenti di cellule in coltura da parte di virus, che sono in condizioni ordinarie litici, risiede nell'ipotesi che i meccanismi operanti in tali infezioni croniche somiglino a quelli responsabili delle infezioni naturali lente, indotte da virus negli animali e nell'uomo.

f) Virus oncogeni. Nell'ambito degli studi condotti sul virus (FLV) e sulle cellule eritroleucemiche (FLC) di Friend e parallelamente sull'azione dell'interferone (IFN) su questo complesso sistema sono stati ottenuti alcuni nuovi risultati. E' stato dimostrato che l'infezione in vivo con il ceppo anemico (FLV-A) ed il ceppo policitemico (FLV-P) determina un aumento significativo dei linfociti T soppressori ed una diminuzione "drammatica" delle cellule NK, eventi che possono giocare un ruolo non trascurabile nell'insorgenza della eritroleucemia. Inoltre le variazioni del livello dei fattori timici circolanti e della tetra-positività degli splenociti determinate dall'infezione con FLV-A sembrano causate dal componente difettivo del complesso virale (SFFV).

Lo studio dei precursori emopoietici (BFU-E, CFU-E, GM-CFU) delle serie rossa e mielomacrofagica in topi infettati con FLV-P e FLU-A del complesso di Friend è stato esteso in due direzioni: interazioni precursore-ormoni emopoietici e analisi molecolare delle sequenze virali presenti nelle popolazioni cellulari degli organi emopoietici. In sistemi di coltura con 0 e 4% di siero fetale è stato osservato che l'FLV-P causa la formazione di CFU-E totalmente insensibili all'eritropoietina e di BFU-E con una curva dose-risposta al B.E.F. (Burst Enhancing Activity) nettamente spostata a sinistra. Ciò si può interpretare come conseguenza o della trasformazione leucemogena dei precursori o della produzione addizionale di ormoni eritropoietici in vitro da parte delle cellule infettate. Mediante ibridazione molecolare in fase liquida con probes specifici per il SFFV e il FLV si è dimostrato che sequenze di RNA virali specifiche sono riconoscibili in pools di BFU-E e GM-CFU, senza differenze quantitative significative fra serie rossa (BFU-E) e serie mielomacrofagica (GM-CFU). La possibilità di coltivare i precursori eritroidi e mielomacrofagici ha inoltre permesso di condurre studi sull'influenza delle prostaglandine e IFN sulle cinetiche dei precursori eritroidi umani e di topo. I rapporti tra interferone (IFN) e sistema di Friend sono stati approfondo-

diti con i seguenti risultati: a) sono stati caratterizzati varianti di cellule di Friend (FLC) selezionati per la resistenza all'azione di IFN senza previa mutagenizzazione. Sono stati messi a punto sistemi di coltura per le FLC in assenza totale di siero fetale di vitello per lo studio delle condizioni di crescita cellulare in presenza di sostanze tutte note e modulabili a volontà. Risultati preliminari indicano che gli effetti di IFN già descritti sono riproducibili anche in queste condizioni,

b) sulle FLC parentali è stata saggiata l'attività della ornitina decarbonilasi, un enzima che svolge un ruolo cardine nelle biosintesi delle poliammine; c) per quanto riguarda gli studi sul ruolo di fattori peptidici non-istonici presenti nella cromatina, è stato osservato che la quantità di tali fattori estraibile a pH 9,5 dalla cromatina di splenociti di topini DBA/2, infettati con il virus di Friend, diminuisce sensibilmente in seguito all'infezione; d) è stato studiato l'effetto del trattamento con tossina colerica o con la sua subunità B sullo stabilirsi dello stato antivirale indotto da IFN. Il trattamento preventivo o simultaneo con tossina riduce sensibilmente gli effetti dell'IFN a livello delle FLC; non si tratta comunque di "competizione" diretta per lo stesso sito recettoriale, né di coinvolgimento dell'adenil-ciclastasi.

Parallelamente a quanto sopra descritto sono stati iniziati studi sull'attività antivirale di alcuni inibitori della sintesi proteica verso virus litici,

### 1.B.3. Malattie parassitarie

a) Malaria. Sono continuate le ricerche sulla malaria in relazione allo studio dei fattori genetici che influenzano la produzione an-

ticorpale nell'infezione sperimentale ed in seguito a vaccinazione. Usando come modello la malaria dei roditori (Plasmodium berghei) sono stati eseguiti studi sulla composizione antigenica di estratti di plasmodi, immunizzazione dell'ospite con estratti di origine parassitaria ed immunizzazione con plasmodi inattivati per mezzo di irradiazione. Sono stati, inoltre, condotti ulteriori esperimenti atti a chiarire il significato genetico della frazione ripetuta del DNA di Plasmodium berghei in relazione alla gametogenesi. A tale scopo sono stati prodotti cloni da una popolazione di parassiti intraeritrocitari per seguire l'andamento nel tempo della presenza di gametociti morfologicamente identificabili, della produzione di oocisti da parte dei gametociti nel vettore (Anopheles stephensi) e della percentuale di DNA ripetitivo.

Le ricerche entomologiche hanno riguardato la valutazione della capacità vettrice in alcune popolazioni di Anopheles, importanti nella trasmissione. Indagini condotte in Italia meridionale hanno messo in evidenza elevate densità di Anopheles labranchiae ed An. superpictus, particolarmente in alcune zone della Calabria. Per ciascuna di queste zone si è cercato di stabilire località tipo in cui eseguire studi sulla capacità vettrice. Sono state, inoltre, condotte ricerche sulla applicazione di metodi genetici nello studio degli anofelini. Per mezzo dell'introduzione di tecniche enzimo-genetiche è stato possibile estendere l'identificazione delle specie vettrici allo stadio di alata, cosa particolarmente utile in rapporto a ricerche epidemiologiche.

Nell'ambito di un programma svolto con il contributo finanziario dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, finalizzato alla possibile produzione microbiologica di antigeni della malaria, in DNA totale di P. berghei è stato sottoposto all'azione di enzimi di restrizione ed i frammenti sono stati inseriti nel plasmide chimera PHC 303, che permette la selezione dei cloni recombinanti, mediante la produzione di proteine ibride con la beta-galattosidasi batterica. Si è anche proceduto alla traduzione in vitro degli RNA messaggeri purificati dagli stati intraeritrocitari del Plasm-

dio . Sono altresì proseguiti studi per la caratterizzazione del genoma del plasmodio della malaria, in relazione ad eventuali differenze tra le varie forme del ciclo. E' stato effettuato un clonaggio del ceppo di P. berghei NK 65 contenente gametociti attivi. La determinazione dei livelli di DNA ripetitivo nel ceppo e nei cloni da esso derivati ha suggerito che un fenomeno di amplificazione genica sia alla base del processo di differenziazione in gametociti.

b) Toxoplasmosi. E' stata completata una ricerca sulla prevalenza di anticorpi antitoxoplasma nella gestante a termine in una popolazione campione di un'area geografica definita. La prevalenza di anticorpi è risultata costante nelle partorienti di varia età esaminate ed interessante il 40% circa delle partorienti. I risultati suggeriscono la possibile formazione di anticorpi anamnesticici per infezioni pregresse alla gravidanza.

c) Leishmaniosi. Poiché non è ancora conosciuta l'identità del ceppo/i del parassita presente/i in Italia, una parte dell'indagine è stata rivolta all'isolamento ed alla coltura in vitro ed in vivo di ceppi di Leishmania da vari ospiti vertebrati provenienti da diverse aree. Dopo l'ottenimento di 15 isolati di Leishmania (1 proveniente dall'uomo, 9 provenienti dal cane, 4 provenienti dal ratto ed 1 proveniente dalla volpe), la tipizzazione biochimica (analisi degli isoenzimi) di tali isolati, effettuata nella Scuola di Medicina Tropicale di Londra, ha messo in evidenza che tutti gli isolati appartengono ad uno stesso "tipo" riferibile al gruppo L. donovani, agente della leishmaniosi viscerale, e che, quindi, i parassiti isolati dai vari ospiti vertebrati sono i medesimi che causano la malattia nell'uomo. In seguito all'isolamento del parassita dal ratto (R. rattus) è stato affrontato per la prima volta il problema riguardante il rapporto R. rattus-Leishmania per cercare di

chiarire il ruolo di questo ospite. I risultati di esperimenti effettuati su una popolazione naturale, quindi eterogenea, di ratti hanno messo in evidenza una certa variabilità di risposta al parassita, per cui alcuni esemplari di ratto si sono mostrati assolutamente refrattari all'infezione, mentre altri, almeno nei primi mesi non sono riusciti a controllare il proliferare dal parassita. Anche la risposta immunitaria, rilevata con l'immunofluorescenza, ha mostrato una certa variabilità; infatti dopo circa un anno alcuni esemplari continuavano a mantenere un titolo anticorpale abbastanza elevato (in assenza di parassiti nella milza), mentre per altri il titolo si era notevolmente abbassato. Ulteriori ricerche sul cane quale serbatoio del parassita sono state eseguite nel focolaio di Monte Argentario. In particolare è stata eseguita l'evoluzione della malattia nei soggetti risultati positivi all'I.F. al momento della prima indagine.

Per quanto riguarda i vettori della leishmaniosi nel Grossetano, è stata condotta una ulteriore indagine sulla distribuzione e densità delle specie Phlebotomus perniciosus e P. perfiliewi. Nella zona studiata P. perfiliewi è risultata essere predominante e quindi, in questa area della provincia di Grosseto, la specie potrebbe avere un ruolo anche nella trasmissione della leishmaniosi viscerale.

Sono stati identificati, per la prima volta in Italia, alcuni focolai larvali extradomestici di P. perfiliewi e P. perniciosus.

d) Tripanosomiasi. Nell'ambito di un programma svolto con il contributo finanziario dell'OMS, sono proseguiti studi sul DNA del Kinetoplasto di Tripanosoma, bersaglio della maggior parte dei farmaci anti-tripanosomiaci. I frammenti di restrizione di un "minicircle" di K DNA di T. lewisi, clonati in E. coli, sono stati riestratti e sequenziati. Nella sequenza è presente sia la "TATA box" che la "Pribnow box" tipiche di un "promoter" procariotico.

e) Echinococcosi umana. Nell'ambito di un programma svolto con il contributo finanziario dell'OMS, essenzialmente rivolto all'isolamento di antigeni di Echinococcus granulosus ed alla loro caratterizzazione chimica ed immunochimica, è stato messo a punto il metodo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) per la diagnostica sierologica dell'idati-dosi umana.

f) Eosinofili umani e malattie da parassiti. Studi di microscopia elettronica hanno evidenziato l'esistenza di differenze morfologiche tra eosinofili circolanti di donatori sani e di soggetti infestati da parassiti (schistosomiasi, ascariasi, filariasi, ecc.).

g) Tossicosi da punture di artropodi, ed artropodi molesti. Il problema delle reazioni patologiche, anche imponenti, dovute all'introduzione di sostanze tossiche contenute nelle ghiandole salivari di artropodi ematofagi, ha reso necessario intraprendere ricerche sulla distribuzione stagionale, sull'habitat preferenziale e sui diversi fattori fisici e biologici relativi alle specie a maggiore diffusione. Tra i ditteri che attaccano l'uomo in modo massivo, in ambiente extradomestico, i tabanidi sostengono un ruolo non trascurabile; le ricerche effettuate nella riserva di Castel Porziano hanno dimostrato che la presenza delle specie di Haematopota costituisce il problema più grave a causa della loro abbondanza e degli attacchi massivi all'uomo. Per quanto riguarda le parassitosi cutanee, quali la pediculosi e la scabbia, è stata continuata l'attività di sorveglianza e di educazione sanitaria, in collaborazione con il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, e sono stati valutati i metodi di diagnosi e di terapia.

h) Vettori di malattie batteriche e virali. L'aumento costante

dei casi di rickettsiosi da Rickettsia conori in Italia ha richiamato la attenzione sul problema degli Ixodidi quali vettori di malattia. Sono state pertanto continuate le ricerche rivolte allo studio della distribuzione, biologia e tassonomia di Ixodidi italiani, e saranno proseguite in collaborazione con i Laboratori di Malattie Batteriche e Virali e di Veterinaria. In particolare è proseguito lo studio relativo a 5 specie di Ixodidi in due ambienti diametralmente opposti alla periferia di Roma,

i) Lotta biologica. I problemi posti dall'impiego degli insetticidi organici di sintesi, quali i riflessi sugli equilibri biologici e l'insorgenza sempre più frequente del fenomeno della resistenza, hanno determinato l'indirizzo su studi e ricerche tendenti a mettere a punto metodi alternativi di lotta, che, non comportino rischi tossicologici. Nel campo della sanità pubblica la lotta biologica che attualmente si presenta più promettente è quella che prevede l'impiego di formulazioni di batteri sporigeni entomopatogeni e di regolatori della crescita degli insetti. Le ricerche hanno riguardato, pertanto, la valutazione in laboratorio di due formulazioni di regolatori della crescita e di tre formulazioni del serotipo H-14 di Bacillus thuringiensis nei confronti di specie di Culicidi a maggiore diffusione nel territorio nazionale e/o di vettori allevati nell'Insettario di questo Istituto. Sono stati effettuati prove con formulazioni microincapsulate di regolatori della crescita, allo scopo di determinare l'attività residua dovuta al lento rilascio del principio attivo, e sono stati determinati i valori delle  $LC_{50}$  ed  $LC_{90}$  di nuove formulazioni in polvere di B. thuringiensis H-14. La notevole efficacia di tali formulazioni è stata confermata da una prova preliminare di campo. Nell'ambito delle attività tendenti alla identificazione, alla valutazione ed allo sviluppo di nuovi organismi entomopatogeni, sono state condotte ricerche sulla presenza di patogeni negli stadi larvali di

Culicidi. Dopo la identificazione e l'isolamento di Fusarium oxysporum da larve di Aedes detritus, sono state effettuate prove di laboratorio sul potere patogeno di tale fungo su altre specie di Culicidi.

j) Messa a punto di nuove metodiche. Alcune malattie da protozoi hanno la caratteristica di provocare la comparsa di anticorpi specifici umorali nell'ospite. Sfruttando questa capacità è stato possibile applicare i metodi sierologici, opportunamente modificati, utilizzati in batteriologia e virologia, quali l'immunodiffusione, l'immuno-elettroforesi, l'immunofluorescenza e l'ELISA test. Queste metodiche sono state applicate con vario significato alla malaria ed alla leishmaniosi. Allo scopo di mantenere ceppi di protozoi (Plasmodium berghei, Trypanosoma lewisi, Leishmania donovani) è stata messa a punto la metodica di conservazione in azoto liquido. Sono stati, inoltre, allestiti terreni di coltura selettivi per la produzione di antigeni per tests sierologici.

#### 1.B.4. Sanità veterinaria

Le ricerche svolte hanno interessato problemi di diagnostica, di epizootologia e di profilassi delle malattie virali, batteriche e micotiche degli animali e lo studio di patogenesi di forme infettive poco note.

Il progetto di maggiore impegno è stato quello finalizzato al controllo della rabbia silvestre. Le ricerche, che costituiscono la continuazione di linee già perseguite nel 1979 sono state condotte in col-

laborazione con alcuni Istituti Zooprofilattici e con l'Istituto delle Malattie infettive, Profilassi e Polizia veterinaria dell'Università di Bologna con lo scopo di verificare la validità di un sistema di immunizzazione nel bovino seguendo le raccomandazioni dell'OMS che suggeriscono l'uso di vaccini antirabbici inattivati soli o associati ad altri vaccini. I risultati dimostrano che non si è mai ottenuto il reisolamento del Virus e le prove diagnostiche hanno sempre dato esiti negativi negli animali vaccinati, confermando la validità del metodo per rivelare gli animali realmente infetti. Lo scrupoloso uso della vaccinazione nelle zone di confine e le severe norme di profilassi adottate hanno permesso di ottenere nel 1980 una forte caduta dell'infezione. Nelle province di Udine e di Bolzano durante il 1980 su 2310 esami eseguiti su selvatici e 228 su animali domestici si sono avuti solo 12 casi di positività per la rabbia così distribuiti: nella provincia di Udine n. 7 volpi, n. 1 capriolo, n. 1 tasso; nella provincia di Bolzano n. 3 volpi.

Una terza linea di ricerca ha riguardato un'indagine sierologica sugli animali domestici, in particolare sul cane, onde stabilire un precedente stato di malattia e valutare quindi l'incidenza della Rickettsia conori in tale specie, è stato possibile isolare da cani il Parvovirus responsabile della gastroenterite, infezione attualmente molto diffusa sia all'estero che in Italia, di cui non si era ancora isolato nel nostro Paese l'agente responsabile.

La ricerca sulla epizootica e la diagnosi della malattia di Tyzzer, è continuata secondo il programma che prevede indagini su giovani animali venuti a morte per fatti diarroici con reperti microbiologici poco chiari o assenti, ma con lesioni patognomiche quali aree di necrosi circoscritte a livello epatico e tentativi di isolamento del germe in colture su uova embrionate, tessuti in vitro e terreni tradizionali cell--free per batteriologia. E' nota infatti l'estrema difficoltà dell'isolamento in coltura di tale microrganismo (Bacillus piliformis),

Sono continuate le indagini sulle micosi sostenute da Candide,

in uno screening su topini con 22 specie di Candida "non pathogenic" tre ceppi hanno manifestato un evidente opportunismo: C. langeronii 1912, C. blankii 1898 e C. lusitaniae 8018. Dagli esami microbiologici e istologici, dalle analisi di parametri ematici e urinari risultata confermato l'opportunismo patogeno delle tre specie di Candida saggate, in particolare di C. langeronii.

L'aumento della specie di Candide responsabili delle candidosi ha indotto ad allargare il campo delle ricerche sulle Candide opportunistiche. Escludendo le otto specie il cui opportunismo è fuori discussione, sono state saggate 20 specie di Candide provenienti da campioni umani o animali o da collezioni. I risultati della ricerca evidenziano un aumento della diffusione in alcuni organi e fanno prospettare l'ipotesi che altre Candide in particolari condizioni dell'ospite rivelino attitudine opportunistiche.

#### 1.C. RICERCHE NEL CAMPO DELLE MALATTIE NON INFETTIVE.

E' riportata una breve sintesi dell'attività per quel che riguarda le ricerche di biologia molecolare, ricerche nel campo delle malattie ematologiche, delle malattie su base immunitaria, delle malattie dell'apparato gastrointestinale e i metodi di chimica e biochimica clinica per la diagnostica.

1.C.1. Ricerche di biologia molecolare.

Correlati allo studio dei meccanismi molecolari alla base dei processi patogenetici di malattie non infettive e finalizzati all'individuazione di metodologie di prevenzione, sono stati sviluppati progetti di ricerca di biologia molecolare nell'ambito delle seguenti tematiche:

a) Radiazioni ultraviolette e meccanismi di riparazione nei procarioti ed eucarioti. Lo studio dei geni implicati nei meccanismi di riparazione dei danni provocati al materiale ereditario dalle radiazioni ultraviolette è stato effettuato sul plasmide TP 120, che conferisce a cellule di E. coli un aumento della UV-resistenza.

Sono state ottenute informazioni sulla lunghezza del gene corrispondente a tale funzione e sul relativo prodotto genico, una proteina, la cui identificazione può consentire di saggiare l'espressione del gene in cellule eucariotiche ed anche in linee cellulari umane derivate da individui affetti da Xeroderma pigmentosum.

b) Acidi nucleici e nucleoproteine. E' stato portato a termine lo studio delle relazioni che intercorrono tra il parametro che caratterizza la rigidità locale del DNA in soluzione e le grandezze medie che definiscono il grado di ripiegamento della macromolecola in soluzione.

Sono stati studiati gli effetti di sali sulla struttura di complessi nucleoproteici ed è stato completato un lavoro di rassegna sulla struttura di complessi binari di mono e polinucleotidi con ioni metallici. Sono stati infine completati studi spettroscopici sulla struttura dell'RNA ribosomale di E. coli, in relazione all'effetto

di ioni e proteine. Sono stati infine compiuti studi NMR ed ESR su complessi Ribonucleasi A-Cu<sup>++</sup>-nucleotidi.

c) Membrane biologiche. Nell'ambito di un programma di ricerca sull'organizzazione topografica di membrane cellulari, in relazione ad implicazioni funzionali quali riconoscimento ed adesività cellulari, sono state studiate le interazioni di polisaccaridi neutri con membrane liposomiali. Sono stati inoltre caratterizzati nell'eritrocita umano fenomeni cellulari quali transizioni di fase e processi di risigillamento di membrana, nonché la formazione di vescicole nell'eritrocita a seguito dell'interazione con destrani.

Nell'ambito di un progetto di ricerca sull'organizzazione della membrana durante il differenziamento cellulare, allo scopo di identificare i diversi parametri che concorrono alla specializzazione della cellula rossa, sono state studiate le glicoproteine della membrana della serie eritroide del tritone (Triturus cornifex) a diversi stadi differenziativi

Sono stati completati studi strutturali dell'involucro cellulare di E. coli e delle sue modificazioni in carenza di cationi bivalenti.

Ricerche volte a caratterizzare i meccanismi molecolari dell'attività litica esercitata da peptidi naturali in membrane hanno evidenziato le variazioni conformazionali e strutturali di uno di questi peptidi (melittina) nell'interazione con membrane fosfolipidiche.

d) Ultrastrutture biologiche: studi mediante Microscopia Elettronica. Sono stati condotti studi di analisi a raggi X con microsonda elettronica di campioni biologici, con particolare riguardo alla loca-

lizzazione dell'adenocromo in tessuti di Octopus V. Sono stati altresì condotti studi su films sottili per l'utilizzo come supporti di campioni biologici in microscopia elettronica. E' stata infine elaborata un'indagine sullo stato della microscopia elettronica in Italia.

e) Applicazioni biologiche delle risonanze magnetiche nucleari. Nel 1980 sono state messe a punto tecniche NMR di rivelazione e determinazione quantitativa di metaboliti fosforilati all'interno di cellule e tessuti funzionanti in vitro, al fine di studiare le modificazioni metaboliche indotte dall'azione di farmaci e sostanze chimiche, oppure da alterazioni patologiche.

f) Interazione della radiazione elettromagnetica con sistemi biologici: Studi spettroscopici del ruolo di ioni metallici in molecole biologiche. E' continuata la ricerca sul ruolo di ioni bivalenti nella struttura di acidi nucleici e loro componenti mediante spettrofotometria UV e spettroscopia X ad alta risoluzione con luce di sincrotrone, in collaborazione con l'Università di Perugia, l'Istituto di Fisica dell'Università di Roma e i Laboratori Nazionali di Frascati.

Nel corso del 1980 è stato quasi completato uno studio sul ruolo di alcuni ioni bivalenti ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , ecc.) nella struttura del rRNA e tRNA. Si è trovato che mentre il  $Mg^{2+}$  e il  $Ca^{2+}$  determinano essenzialmente un aumento delle interazioni base-base dovute al legame degli ioni con i gruppi fosfato, per il  $Mn^{2+}$ , oltre a questo tipo di legame, è possibile una interazione degli ioni con le basi del tRNA.

Per quanto riguarda l'indagine sul sito di legame del  $Mn^{2+}$  in acidi nucleici, iniziata alla fine del 1979 con metodi di spettrometria X

ad alta risoluzione utilizzando la radiazione di sincrotrone a Frascati, sono stati studiati, nel corso del 1980, composti inorganici e complessi con nucleotidi. L'analisi di composti a struttura nota ha confermato la validità della metodologia, sviluppatasi di recente, per la determinazione della simmetria del sito e della distanza degli atomi vicini allo ione metallico; per quest'ultima determinazione è stata necessaria la messa a punto di un elaborato metodo di analisi dei dati. La struttura fine dello spettro ha fornito l'evidenza sperimentale di effetti di "stato solido" negli ossidi semplici (M. Belli et al. Solid State Communications, 35, 355-361 (1980)) e ha mostrato che il  $Mn^{2+}$  è ottaedricamente coordinato nei complessi con nucleotidi (AMP, ATP, UTP) formando sostanzialmente "clusters" tipo  $MnO$  ; attraverso una opportuna analisi degli spettri sono stati inoltre ottenuti dati preliminari sulle distanze Mn-O e Mn-P.

#### 1.C.2. Malattie ematologiche.

Gli argomenti di ricerca in questo settore hanno riguardato lo studio dei meccanismi eziopatogenetici e la fisiopatologia di alcune malattie dell'eritrocita e di alcune malattie emorragiche e tromboemboliche.

Tutti questi programmi rappresentano la continuazione e lo sviluppo di linee di ricerca in corso negli anni precedenti.

L'attività di ricerca per quel che riguarda le malattie ereditarie dell'eritrocita si è sviluppata secondo quattro linee: a) emocitometria; b) deficit enzimatici del globulo rosso e anemie emolitiche; c) rapporti struttura e funzione di emoglobinopatie; e d) le talassemie.

a) Emoglobinometria ed emocitometria. E' proseguita l'attività, in qualità di laboratorio di riferimento, per il controllo dello standard internazionale di cianometemoglobina (HiCN Reference preparation WHO ICSH) e per la standardizzazione ed il controllo di qualità dei metodi biochimici-ematologici impiegati nei laboratori specializzati di ematologia delle strutture sanitarie. (L. Tentori e coll. "Diagnosi e screening della beta-talassemia" I Corso teorico-pratico, Roma ISS 9-13 giugno 1980 ISS-CNR Progetto finalizzato Medicina Preventiva. Sub-progetto Malattie ereditarie dell'eritrocita; L. Tentori e coll. "Metodiche per lo studio delle talassemie" ISSN 0391 1675 ISTISAN 1980/36 PNI T 80/2 e 15/225). E' stato inoltre messo a punto e proposto un metodo rapido spettrofotometrico per lo studio delle proprietà fisiologiche di soluzioni purificate di emoglobina (Ruschetti R. e coll. "Studio delle proprietà fisiologiche di soluzioni purificate di emoglobina mediante misure rapide spettrofotometriche. Giornale Italiano di Biochimica 5/1, 63, 1980).

b) Deficit enzimatici del globulo rosso e patologia emolitica. E' proseguito il lavoro come laboratorio di riferimento nazionale per l'individuazione dei deficit enzimatici correlati ad una patologia emolitica e per la caratterizzazione biochimica e funzionale delle varianti enzimatiche responsabili di tale patologia. Sono state richieste dalle strutture sanitarie periferiche circa 500 consulenze e sono stati individuati 81 deficit di glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD), di cui 8 associati a tratto beta-talassemico, 2 a varianti emoglobiniche e 4 deficit di piruvatochinasi. In un caso di associazione del difetto di G6PD con una emoglobina instabile, la Hb Belfast, è stato effettuato uno studio delle interazioni fra i due difetti molecolari a livello di sintesi globinica e metabolismo eritrocitario. E' stata proseguita

l'attività per la standardizzazione dei metodi diagnostici per la rilevazione dei difetti enzimatici eritrocitari, E' iniziata una ricerca sul problema dell'invecchiamento del globulo rosso in vivo ed in vitro con la finalità di approfondire lo studio delle modificazioni post-traduzionali delle molecole enzimatiche normali e varianti e delle alterazioni metaboliche eventualmente indotte nel globulo rosso. A tale scopo sono stati messi a punto metodi di frazionamento dei globuli rossi in sub-popolazioni di diversa età. Gli studi in questa prospettiva potranno dare un importante contributo alla conoscenza dei meccanismi molecolari dei difetti enzimatici e nuovi criteri sia per l'individuazione dei difetti stessi che per la caratterizzazione delle varianti patologiche.

c) Rapporti tra struttura e funzioni delle varianti emoglobiniche. E' proseguita per il 1980 l'attività del Centro di Riferimento Nazionale per le Emoglobinopatie. Sono stati esaminati circa 350 campioni di sangue di soggetti talassemici e/o emoglobinopatie. Sono state caratterizzate da un punto di vista strutturale e funzionale alcune varianti emoglobiniche presenti in campioni di sangue di individui provenienti da differenti regioni italiane inviati per accertamenti diagnostici. Tra queste sono da segnalare la completa caratterizzazione di una nuova variante, l'Hb Bologna, che presenta diminuita affinità per l'ossigeno e alcune rare varianti emoglobiniche, accertate per la prima volta in Italia, quali l'Hb M Iwate e l'Hb Belfast, quest'ultima osservata in combinazione con deficit di G-6-DP. Un'altra linea di ricerca ha interessato lo studio del controllo post-traduzionale di alcune varianti emoglobiniche. I risultati hanno indicato il ruolo dell'affinità preferenziale delle catene globiniche per le catene complementari nel determinare il livello percentuale di alcune varianti emoglobiniche nel sangue periferico. E' continuato inoltre lo studio a livello biochimico

e) Fattori K dipendenti. Le ricerche condotte in collaborazione con la Cattedra di Ematologia dell'Università di Roma sulla carenza congenita dei fattori K dipendenti con particolare riferimento al fattore VII hanno dimostrato che nell'emofilia B<sub>M</sub> esiste una parziale carenza di tale fattore correlata a varie cause quali l'età, la presenza di inibitori della forma attivata, la moderata deficienza di vit. K. In collaborazione con la Clinica Medica II dell'Università di Roma sono state inoltre effettuate ricerche sulla carenza acquisita del fattore VII in soggetti con disordini epatici nei quali le anomalie biochimiche e cliniche sono state valutate in rapporto a quelle coagulatorie ed in particolare ai livelli di fattore VII (attività ed antigene). Sulla base dei risultati ottenuti in soggetti con vario grado di cirrosi epatica è stato messo in evidenza che la concentrazione di fattore VII dipende solo dalla capacità sintetica dell'epatocita e pertanto il suo livello rappresenta un valido indice di danno epatico.

f) Fibrinogeno. E' stato preso in esame un caso di disfibrinogenemia congenita con lo scopo di fornire indicazioni utili ad una migliore conoscenza della fisiopatologia della fibrinoformazione e della molecola del fibrinogeno. Gli studi funzionali effettuati sulla molecola purificata hanno evidenziato che il difetto è dipendente dalla mancata polimerizzazione dei monomeri di fibrina mentre è normale il distacco dei fibrinopeptidi A e B. Lo studio di alcune caratteristiche fisico-chimiche (p.m., p I, proprietà elettroforetiche ed immunoelettroforetiche) non ha tuttavia fornito elementi per l'identificazione dell'alterazione biochimica rendendo plausibile l'ipotesi che, come per le emoglobinopatie, la sostituzione di un singolo amminoacido in posizione critica sia in grado di produrre una anomalia funzionale del fibrinogeno.

L'attività nel settore ha compreso anche ricerca metodologica e di standardizzazione. In questo ambito sono stati effettuati trials multi-

e genetico-popolazionistico della variante Hb Hasharon presente con una certa frequenza (0,25 per cento) nel Polesine. I risultati ottenuti dimostrano che questa variante è linked ad un determinante per l'alfatalassemia, il che spiega la frequenza osservata in aree come il Polesine dove la malaria è stata per lunghi anni endemica. E' stata ultimata una ricerca comparata sulla affinità per l'ossigeno delle frazioni emoglobiniche A e B presenti nella pecora in condizioni normali e della frazione C che compare in risposta a situazioni di grave ipossia tissutale. I risultati ottenuti dimostrano che la frazione emoglobinica C presenta una affinità per l'ossigeno e un effetto Bohr più elevati rispetto ai componenti normali A e B.

d) Le talassemie. E' stata effettuata una ricerca sull'eterogeneità dell'HbF (gamma/G e gamma/A) in soggetti normali. Questo studio ha indicato un'ampia variabilità individuale del rapporto gamma/G: gamma/A. Una seconda ricerca su alcuni gruppi familiari, originari dell'Italia Meridionale, portatori di associazione di beta-talassemia e persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH) di tipo eterocellulare ha permesso di accertare che il quadro clinico grave degli omozigoti beta-talassemici viene in questa situazione notevolmente attenuato. E' proseguita inoltre la attività di ricerca diagnostica biochimico-ematologica a supporto del Centro di Diagnosi Prenatale della II Clinica Ostetrica dell'Università di Roma: sono state esaminate 60 coppie a rischio per beta-talassemia e sono stati identificati 14 feti affetti da beta-talassemia omozigote.

Per quel che riguarda le malattie emorragiche e tromboemboliche nel 1980 sono proseguiti gli studi sulla fisiopatologia delle sindromi emorragiche e tromboemboliche attraverso ricerche sulle caratteristiche biochimiche e funzionali di molecole varianti. In particolare sono stati presi in considerazione i fattori K dipendenti e il fibrinogeno.

centrici per lo studio di nuovi metodi di indagine e per la comparazione di reagenti commerciali. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il metodo cromogeno per il dosaggio del fattore X rappresenta un potenziale nuovo approccio per il controllo della terapia con anticoagulanti orali; studi longitudinali sono tuttavia necessari per la valutazione della sua validità chimica, Il metodo cromogeno è risultato utile anche per l'identificazione delle carenze AT III che si instaurano in particolari condizioni patologiche (cirrosi epatica, infarto del miocardio, nefrosi, diabete mellito), La valutazione multicentrica dei reagenti commerciali per lo screening dell'Emofilia A ha dimostrato che tutti i reagenti sono in grado di mettere in evidenza difetti moderati, ma non tutti difetti "borderline". Nell'ambito di queste attività è stato organizzato presso questo Istituto il "1st International Symposium on Standardization and Quality Control of Coagulation Test".

### 1.C.3. Malattie endocrine e del metabolismo.

Sono stati sviluppati in particolare due progetti: la fisiopatologia della tiroide e alcuni errori congeniti del metabolismo.

Anche questi programmi costituiscono la continuazione e lo sviluppo di ricerche iniziate negli anni precedenti.

a) Fisiopatologia della tiroide. Il programma è articolato su due linee principali:

i) studio biochimico e funzionale di molecole coinvolte nella sintesi e nel trasporto di fattori che regolano il metabolismo.

ii) studio della funzionalità tiroidea neonatale attraverso

uno screening pilota dell'ipotiroidismo congenito (I.C.).

Per ciò che riguarda la prima linea di ricerca sono state oggetto di studio la tireoglobulina umana (Tg) e la globulina legante la tiroxina (TBG).

I risultati finora raggiunti documentano che i frammenti triplici della Tg umana mantengono attività antigenica che è tanto maggiore per i frammenti a p.m. maggiore. Questa osservazione è in accordo con quanto si conosce sulla importanza della conformazione molecolare per il mantenimento della attività antigenica. Infatti si può presumere che i frammenti a p.m. più elevato abbiano maggiore possibilità di conservare la conformazione ottimale della molecola nativa. Tra i frammenti a p.m. elevato, due sono stati purificati al fine di continuare gli studi di caratterizzazione.

Per ciò che riguarda la seconda linea, fa parte di questo programma di ricerca una indagine pilota multicentrica per lo screening dell'ipotiroidismo congenito iniziata nel 1978. L'elaborazione dei dati (in totale 36.000 casi) ha dimostrato una frequenza nella popolazione italiana di 1/3.000. Nell'ambito di questa ricerca è stato inoltre studiato e avviato un controllo di qualità nazionale interlaboratori,

Nell'ambito del programma un'altra linea si propone di studiare nei neonati pretermine e in quelli a basso peso per età gestazionale il comportamento dell'ormone tireotropo (TSH), degli ormoni tiroidei ( $T_4$ ,  $FT_4$ ,  $T_3$ ,  $RT_3$ ) e della globulina di trasporto della tiroxina (TBG). I risultati hanno dimostrato una correlazione inversa tra concentrazione di  $T_4$  ed età gestazionale contrariamente a quanto appare per quanto riguarda il TSH. Non sono possibili per il momento altre correlazioni per le qua-

li occorre ampliare il numero dei soggetti studiati,

b) Errori congeniti del metabolismo. Il programma si articola su due linee principali: a) malattie lisosomiali e b) galattosemie.

Per ciò che riguarda le malattie lisosomiali, sono stati presi in considerazione alcuni tests biochimici specifici per l'identificazione di enzimi lisosomiali correlati a malattie genetiche e che possono essere applicati su cellule coltivate in vitro da liquido amniotico e quindi utilizzabili per diagnosi prenatale e ne è stata valutata l'affidabilità e la riproducibilità.

Per la linea di ricerca "galattosemie" sono state esaminate ed ottimizzate le metodiche da applicare in uno screening neonatale di galattosemia; è stato inoltre messo a punto un nuovo metodo di dosaggio quantitativo automatizzato dell'enzima galattosio-1-fosfato midiltransferasi. La metodica dell'isoelettrofocalizzazione è stata applicata allo studio delle microeterogeneità dell'enzima galattosio-1-fosfato midiltransferasi ed alle sue varianti; per la prima volta le varianti Duarte e Los Angeles sono state risolte in 5 isoenzimi.

#### 1.C.4. Malattie su base immunitaria.

a) Immunobiologia. Nell'ambito di programmi di ricerca volti allo studio dei meccanismi e del controllo della risposta immune nell'uomo, del suo controllo genetico, dei diversi tipi e sottotipi di cellule coinvolte, dei difetti immunologici che stanno alla base di diverse malattie e dei fattori degenerativi dell'invecchiamento, sono stati messi a punto metodi in vitro per l'induzione della risposta anticorpale specifica primaria in linfociti isolati dal sangue periferico umano. Sono stati anche studiati a) gli effetti dell'interferone sulla

generazione di cellule ad attività citotossica in colture linfocitarie miste

b) l'aumento dell'attività soppressoria di popolazioni linfocitarie durante l'invecchiamento.

b) Immunochimica. Le relazioni tra proprietà strutturali ed attività immunologica di preparati polisaccaridici sono state studiate in vitro ed in vivo, utilizzando un sistema modello costituito da stea-roildestrani adsorbiti su membrane liposomiali. E' stato dimostrato che il "carrier" liposomale riduce da una parte la flessibilità segmentale del polisaccaride adsorbito, ed induce dall'altra un potenziamento dell'azione tollerogena di questo in topi "inbred" Balb/c, sia al livello umorale che al livello cellulare. Sono state altresì studiate le oscillazioni nell'affinità anticorpale di immunoglobuline IgM al livello di immunociti singoli.

c) Collagenopatie. Sono stati condotti studi sulla specificità degli anticorpi antinucleo e sul loro significato clinico nelle collagenopatie. Sono state a tale scopo standardizzate tecniche immunochimiche per la determinazione della specificità degli anticorpi diretti contro una pluralità di antigeni nucleari, con particolare riguardo al DNA nativo e denaturato e agli antigeni nucleari estraibili (ENA). E' stata valutata l'incidenza di tali anticorpi in una casistica di alcune centinaia di pazienti affetti da varie collagenopatie ed è stata effettuata la correlazione dei profili e dei livelli anticorpali con la sindrome clinica in atto e con la sua evoluzione, in un periodo di tre anni.

d) Standardizzazione immunobiologica. Numerose linee di ricerca sono state sviluppate con lo scopo di aggiornare in Istituto varie tecnologie di standardizzazione immunobiologica ed immunodiagnostica, secondo le esigenze puntualizzate in sede internazionale e secondo le normative proposte dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. In particolare sono stati condotti studi di nefelometria laser per il dosaggio dell'antigene correlato al Fattore VIII, Si sono altresì sviluppate le linee segmenti di ricerca finalizzata: a) utilizzo

di tecniche radioimmunologiche ed immunoenzimatiche per l'analisi dell' Hb<sub>s</sub> Ag in sieri umani ed emoderivati; b) standardizzazione di controlli analitici delle immunoglobuline umane mediante gel-filtrazione ed ultracentrifugazione analitica; c) messa a punto di un test immunoenzimatico per la rivelazione e la determinazione quantitativa di anticorpi antitetanici nei sieri umani; d) tipizzazione tissutale (studio di nuovi sieri anti-HLA: A, B, C, DR); e) applicazione del Limulus amoebocyte lysate (LAL) test alla ricerca dei pirogeni nelle immunoglobuline ed in altri emoderivati.

#### 1.C.5. Malattie dell'apparato gastrointestinale.

##### a) Peptidi di origine alimentari di interesse tossicologico.

Sono state continuate le ricerche precedentemente intraprese sul morbo celiaco. Poiché non esistono adeguati modelli animali per lo studio della celiachia e delle altre intolleranze al glutine, è molto difficile accertare la natura dei componenti tossici presenti nel frumento e il meccanismo dell'azione tossica. Per superare tali carenze metodologiche e conoscitive sono state intraprese ricerche su coltura di intestino tenue di feto di ratto che si differenzia in vitro con formazione di villi. Tale sistema per diverse ragioni è stato ritenuto di interesse per lo studio dei componenti tossici nel morbo celiaco. Con tale sistema sono stati saggiati i digesti ottenuti da frazioni proteiche di frumenti diversi con procedure che simulano la digestione che si verifica nell'intestino umano (pepsina, tripsina, cotazym<sup>R</sup>). E' stato così dimostrato che i prodotti della digestione delle proteine estratte dai frumenti esaploidi (teneri), sono molto attivi nell'inibire reversibilmente lo sviluppo e la morfogenesi dell'intestino di feto di ratto. Inoltre, questi prodotti di digestione sono anche capaci di inibire il recupero morfologico in vitro della mucosa atrofica di pazienti affetti da morbo celiaco; essi spesso causano deterioramento della mucosa ed in alcuni casi inducono persino fenomeni necrotici. I prodotti della digestione delle proteine dei frumenti tetraploidi (duri), saggiati in condizioni sperimentali identiche a quelle dei frumenti teneri, non esplicano alcun effetto tossico sull'intestino fetale di ratto e sono innocui o molto meno tossici per la mucosa atrofica di celiaco in vitro. Poiché è ben noto che nella celiachia vi è

anche una componente immunologica, allo scopo di valutare ulteriormente la significatività dei dati ottenuti, è stato anche intrapreso uno studio sul carattere immunogenico (attività di stimolazione della mitosi linfocitaria) dei peptidi ottenuti dalla digestione delle gliadine di frumenti teneri e duri. I dati preliminari disponibili indicano che non solo i celiaci, ma anche i parenti sani di primo grado dei celiaci presentano una risposta anomala di natura immunologica ai peptidi della gliadina di frumento. Sono inoltre iniziati studi su colture cellulari allo scopo di valutare l'eventuale attività citotossica dei digesti peptidici ottenuti dalle gliadine di frumenti esaploidi e tetraploicidi.

#### 1.C.6. Metodi chimico-fisici per la diagnostica.

a) Applicazioni biomediche delle risonanze magnetiche. E' continuata l'applicazione estensiva della NMR e dell'EPR allo studio della struttura e della concentrazione di metallo-enzimi nei sistemi biologici in situazioni fisiologiche e patologiche. In particolare si sono ottenuti risultati

sulle seguenti linee:

a) è stato messo in evidenza un effetto della temperatura e dell'ossigeno sul livello sierico della ceruloplasmina (CP) dovuta a interconversione di rame tra le varie forme: questo risultato può essere molto importante per applicare l'EPR alla diagnosi di tumori sia solidi che liquidi; b) sono stati misurati i livelli plasmatici di CP e transferrina su pazienti uremici sottoposti a trattamenti di emodialisi: le variazioni significative messe in luce prima e dopo il trattamento permettono da una parte di avere informazioni sull'effetto della dialisi sui livelli plasmatici delle due metallo-proteine, dall'altra consentono di effettuare una valutazione del ferro legato a complessi a basso peso molecolare che, secondo un'ipotesi di Jacobs, è un sistema che si trova fra il ferro

legato alla transferrina e i siti dove avviene la sintesi della emoglobina;

c) sono stati effettuati ulteriori studi spettroscopici del complesso eme-albumina, chiarendo qual'è il sito di interazione e controllando le condizioni di transizione da complesso a basso spin a quello di alto spin;

d) è stato studiato in modo estensivo il sistema quaternario transferrina, ceruloplasmina, ioni ferrosi o ferrici e ioni bicarbonato, al fine di vedere qual'è il ruolo della CP nella sua attività ferrossidasica: nell'ambito di questo lavoro sono stati evidenziati dei complessi tra rame e CP;

e) è stato completato uno studio con NMR ed EPR dell'interazione di ioni rameici con la ribonucleasi A ed è stato evidenziato sia il sito di interazione che la simmetria dei complessi formati e la loro stabilità in funzione del pH.

b) Metodi di chimica e biochimica clinica per la diagnostica.

Sono stati messi a punto e ottimizzati alcuni metodi analitici ed è stato valutato il significato diagnostico di variazioni di parametri ematochimici in soggetti sani o affetti da patologie diverse.

Valori di riferimento relativi agli aminoacidi plasmatici.

I dati della letteratura sull'argomento sono scarsi e si riferiscono tutti all'esame di popolazioni poco numerose. Nell'indagine sono stati raccolti dati riguardanti le concentrazioni plasmatiche della maggior parte degli aminoacidi per circa 600 soggetti apparentemente sani.

Ruolo degli aminoacidi liberi nel liquido seminale.

Si tratta di un'indagine comparativa (soggetti sani e soggetti

affetti da sterilità idiopatica) al fine di evidenziare il ruolo determinante dell'assetto fisiologico degli aminoacidi liberi del liquido seminale nella protezione (sistema tampone) dello spermatozoo a livello vagino-cervicale.

Valutazione di due metodi per il dosaggio dell'HbA<sub>1c</sub>.

E' stato effettuato uno studio comparativo fra due metodi usati per la determinazione della emoglobina glicosilata (HbA<sub>1c</sub>).

Emodialisi e ultrafiltrazione.

Sono state studiate le variazioni dell'affinità per l'ossigeno negli eritrociti di soggetti uremici in trattamento di emodialisi.

#### 1.D. RICERCHE NEL CAMPO DELL'INGEGNERIA BIOMEDICA

a) Oggettivazione di misure in oftalmologia. Per la misura della fluorescenza retinica, nell'ambito della convenzione con il Progetto Finalizzato Tecnologie Biomediche del CNR Subprogetto CARD 4, si è realizzato un misuratore assoluto di fluorescenza emessa dai vasi retinici, a partire dai fotogrammi presi tramite la fundus camera. Lo strumento realizzato ed ora in avanzata fase di collaudo, permette la misura ed anche il raffronto fra due pellicole indipendentemente dalle condizioni di sviluppo e di emulsione delle pellicole stesse.

L'apparecchiatura è stata presentata al Convegno sul Progetto Finalizzato Tecnologie Biomediche del CNR, tenuto presso l'ISS nel maggio 1980.

b) Telemisure di parametri di interesse biomedico mediante radiosonde. Questa ricerca, orientata nel 1980 verso la realizzazione di un sistema per la misura della temperatura e della pressione endocranica, è svolta nell'ambito di una convenzione con il Progetto Finalizzato Tecnologie Biomediche del CNR, Subprogetto CARD 4. E' stato provato in vivo un prototipo di radiosonda che ha fornito ottimi risultati e realizzato un sistema di ricezione e condizionamento del segnale, trasmesso dalla radiosonda, basato sull'impiego di un microcalcolatore.

c) Conteggio di particelle in campo microscopico e loro valutazione dimensionale. Questa ricerca ha lo scopo di realizzare un sistema automatico in grado di fornire una valutazione numerica e dimensionale di particelle presenti in un campo microscopico al fine di evitare errori dovuti alla stanchezza dell'operatore e di automatizzare le misure. Nel corso del 1980 è stato realizzato un prototipo di un sistema, basato su un microcalcolatore e su un array di fotoelementi CCD 100 x 100. Tale sistema ha fornito dei risultati soddisfacenti risolvendo anche dei problemi finora insoluti quale il riconoscimento di particelle particolarmente complesse,

d) Realizzazione di uno spettrofotometro a scansione elettronica veloce. Questa ricerca ha lo scopo di realizzare uno spettrofotometro in grado di fornire contemporaneamente i valori della trasmittanza su tutta la banda operativa di  $4000 \overset{\circ}{\text{Å}} - 8000 \overset{\circ}{\text{Å}}$ . Tale strumento troverebbe una pratica applicazione nell'analisi contemporanea di più sostanze sullo stesso campione e nell'analisi delle cinetiche veloci. Nel corso del 1980 è stato realizzato un progetto completo del sistema e sono state provate alcune funzioni,

e) Acquisizione ed analisi automatica dei movimenti simultanei di più segmenti corporei. Lo scopo di questa ricerca è la realizzazione di strumentazione e la messa a punto di metodiche per l'analisi automatica del movimento. Questa strumentazione è mirata soprattutto alla messa a punto di metodiche basate sull'analisi dell'andatura umana e sarà di estrema utilità nella riabilitazione di handicappati motori, nell'acquisizione di dati obiettivi per il progetto di protesi e nella valutazione delle stesse. Se ne prevede anche l'impiego per l'analisi del controllo del movimento.

f) Realizzazione di protocolli per il testing comparativo della strumentazione elettromedicale. Lo sviluppo della tecnologia applicata alla diagnostica e alla terapia è tale che i medici e gli amministratori ospedalieri si trovano spesso a dover prendere difficili decisioni riguardanti l'acquisto di apparecchi non idonei. A tale scopo si rivela di vitale importanza eseguire prove comparative dei diversi tipi di apparecchi presenti sul mercato che forniscano all'operatore sanitario dei criteri di scelta, soprattutto per quanto riguarda l'aggiornamento tecnologico e l'adeguatezza delle caratteristiche e delle prestazioni essenziali ed opzionali, alle reali esigenze dell'acquirente. Nel corso del 1980 è stato redatto e pubblicato il protocollo per le prove comparative dei defibrillatori.

## 2. SETTORE FARMACI

Gli obiettivi principali che l'Istituto si è prefisso nel cam-

po della ricerca sul farmaco sono i seguenti:

- coltivare lo sviluppo delle attività scientifiche per una migliore valutazione delle qualità farmacologiche e terapeutiche dei farmaci;

- assicurare costantemente una elevata qualità dei prodotti;

- incoraggiare la loro migliore utilizzazione da parte del medico e del paziente.

Tali obiettivi rientrano in quelli enunciati dalla legge sul Servizio Sanitario Nazionale (833/1978) ed in particolare si riallacciano al comma 3) "diagnosi a cura degli eventi morbosi" e al comma 7) "disciplina delle sperimentazione dei farmaci e informazione scientifica" dello articolo 2 della legge.

A tale settore di attività hanno contribuito i Laboratori di Chimica del Farmaco e di Farmacologia.

#### 2.1. Separazione, isolamento e determinazione della struttura di nuove sostanze naturali (screening di nuove piante secondo le direttive OMS).

L'utilizzazione della distribuzione in controcorrente a pH discontinuamente variabile per la separazione di alcaloidi è stata riportata con una breve trattazione matematica e con numerosi esempi di utilizzazione. Sulla base di questo metodo è continuato l'isolamento di nuovi alcaloidi: dalla Strychnos rubiginosa sono stati isolati tre alcaloidi, la strychnorubigina (nuovo) e la normacusina B e la 11-metossidiabolina. Dalla Strychnos spinosa è stato isolato un nuovo alcaloide ad attività convulsivante, la 10-idrossiakagerina. Dalla Strychnos fendleri sono

stati isolati cinque nuovi alcaloidi, chimicamente correlati, che non hanno dimostrato attività citotossica (NCI, Bethesda). Un nuovo alcaloide ad attività convulsivante, la 3-idrossi-diabolina, è stato isolato dalla Strychnos castelneana. Non ha dimostrato attività citotossica la 18-deidro-10-idrossi-nigritanina (Istituto Tumori, Milano), alcaloide dimero isolato negli anni precedenti dalla Strychnos nigritana. Due nuovi alcaloidi indolici pentacicli sono stati isolati da una Strychnos amazonica, la S. hirsuta.

Nella Stephania dinklagei sono stati ritrovati cinque alcaloidi aventi attività sul sistema nervoso centrale. Da altre piante sono stati isolati principi rubefacenti, anti-emorragici ed antiamebici, di questi ultimi, alcuni sono stati preparati per semisintesi.

Dalla Ritchiea longipedicellata, rubefacente usato anche in aromoterapia nella medicina popolare (vedi Farmacopea Senegalese è stata isolata una nuova sostanza di tipo tioossazolico, la cleomina, chimicamente correlata ai senfoli. E' stato completato il lavoro di isolamento ed identificazione dei dieci alcaloidi, due dei quali nuovi, della Hydrastis canadensis.

## 2.2. Applicazione delle tecniche di cromatografia liquida ad alta pressione e di gas cromatografia a problemi analitici.

Tali tecniche sono state applicate con successo per l'identificazione e la determinazione di cefalosporine, di coloranti contenuti nelle preparazioni farmaceutiche, di alcaloidi della Rauwolfia.

Si sono messe inoltre a punto le condizioni per la separazione, identificazione e determinazione di silicristina, silidianina, e silibina negli estratti di Sylibum Marianum e di N-docosanolo nell'estratto di

Pygeum Africanum

Sono in corso indagini per l'identificazione delle impurezze presenti nei principi attivi contenuti sia nelle preparazioni farmaceutiche che in quelle cosmetologiche. Il primo problema che è stato affrontato è quello relativo all'identificazione ed al dosaggio di impurezze (quali la dimetilanilina e la dimetilnitrosamina - DMA e DMNA) presenti in alcuni antibiotici e in specialità contenenti aminofenazone.

Nell'ambito della CEE sono stati approntati nuovi metodi di determinazione quali-quantitativa di coccidiostatici in alimenti animali, ed in particolare: un metodo aggiornato di quantizzazione gascromatografica delle dimetidazolo e dell'ipronidazolo che permette la differenziazione fra i coccidiostatici di struttura nitroimidazolica impiegati in veterinaria; un metodo HPLC per la quantizzazione della pirimetamina contenuta - a livelli di 5 ppm - nei mangimi medicati, e impiegata insieme ad altri coccidiostatici quali l'etopabato, la sulfachinossalina e/o l'amprolium. L'acido iodico è stato usato per il rapido riconoscimento dei più comuni stupefacenti e di altre sostanze presenti nelle miscele usate nel traffico illecito.

Sono stati analizzati lotti diversi di amoxicillina sodica cristallina e liofilizzata. I sali sodici di amoxicillina ottenuti per liofilizzazione contengono considerevoli quantità di oligomeri, mentre quelli ottenuti per precipitazione da solventi non acquosi ne contengono quantità trascurabili. Inoltre è stata studiata tramite cromatografia liquida ad alta pressione, la velocità di formazione di oligomeri in soluzione acquosa al 20% di ampicillina sodica.

2.3. Caratterizzazione del livello di purezza di steroidi ormonali mediante procedimenti cromatografici e di spettrometria di massa.

L'indagine è stata rivolta ad un gruppo selezionato di corticosteroidi, per i quali il metodo di analisi con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) è particolarmente adatto. Sono stati presi in esame due possibili procedimenti per valutare il contenuto di impurezze mediante: a) analisi indiretta; b) analisi diretta.

Per ogni steroido studiato sono stati presi in esame due procedimenti di HPLC, uno in fase diretta e l'altro in fase indiretta, tentando correlazioni fra i due livelli di impurezze e fra i procedimenti HPLC e cromatografia su strato sottile (TLC). Tali lavori hanno fatto oggetto di monografie per la Farmacopea Europea.

2.4. Analisi di sostanze ad azione ormonale in tessuti ed in liquidi biologici, presenti anche come residui non consentiti in tessuti animali.

E' stata portata avanti una ricerca collaborativa sulla definitiva messa a punto del metodo in studio in sede CEE, per la ricerca dei residui di sostanze ad azione anabolizzante nelle carni fresche, curando in particolare il difficile recupero di alcune di quelle sostanze. Successivamente è stata studiata l'applicazione di tale metodo alla ricerca dei residui di sostanze anabolizzanti in diversi tipi di prodotti dietetici omogeneizzati a base di carne ed in questo settore sono stati

ottenuti risultati molto validi in una ampia indagine conoscitiva affidata a questo Istituto. Per questa ricerca è stato messo a punto un metodo di identificazione per tali sostanze, basato sull'impiego della spettrometria di massa, che ha richiesto la formazione di adattati derivati ad una purificazione molto spinta di essi, tenuto conto di dover operare con microquantità di campioni.

#### 2.5. Studio di nuove molecole ad attività psicotropa.

In tale settore sono stati preparati vari composti a nucleo 1,4-benzodiazepinico ancora non noti, aventi gruppi funzionali amminici diversi nelle posizioni 2 e 3: su di essi (circa 40 nuovi composti) è in corso uno screening farmacologico.

#### 2.6. Effetti di modifiche chimiche nella molecola della colchicina in relazione alla sua attività biologica e tossicità. (Programma in collaborazione con la Sezione di "Medicinal Chemistry")

La molecola della colchicina presenta tre regioni dove sono possibili modifiche chimiche senza distruggere la sua struttura tricyclica. Esse sono: tre gruppi metossilici dell'anello A, la catena laterale sul centro chirale dell'anello B, e la struttura tropolonica dell'anel-

lo C. I composti presi in esame sono stati ottenuti: per odemetilazione selettiva nell'anello A e per sostituzione del gruppo acetamidico nell'anello B con una diversa funzione azotata o ossigenata, o con un doppio legame o per inversione della configurazione al centro asimmetrico C-7. I primi risultati delle relazioni per attività antitumorale, tossicità e variazioni strutturali hanno messo in evidenza che i composti ad elevata attività sono anche molto tossici. Comunque le varie sostituzioni apportate hanno caratterizzato alcune parti essenziali per l'attività e la combinazione di tutte queste sostituzioni attivanti potrebbe dar luogo ad un derivato dotato di elevata attività e minore tossicità. Sempre nel campo della colchicina sono state identificate tre impurezze (alcaloidi colchicinosimili) in campioni commerciali di colchicina. La struttura chimica di questi tre alcaloidi minori, isolati mediante TLC e HPLC, è stata evidenziata mediante spettroscopia di massa.

#### 2.7. Aspetti conformazionali di ioduri di acetossipiperidinio ad azione colinergica.

Analoghi ciclici dell'acetilcolina (ACh), nei quali le relative disposizioni del centro ammonico quaternario e del gruppo acetato sono più o meno rigide rispetto a quelle dell'ACh stessa, possono dare informazioni sulla "conformazione attiva" dell'ACh nell'interazione con il recettore specifico (muscarinico, nicotínico e delle colinesterasi). A questo scopo sono stati sintetizzati alcuni ioduri di N,N-dimetilacetossipiperidinio con sostituenti C-Me in varie posizioni dell'anello piperidinico. La loro conformazione preferita è stata stabilita soprattutto mediante spettroscopia NMR. I vari prodotti sono stati valutati come

colinergici muscarinici e come substrati per acetilcolinesterasi. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che solo gli isomeri trans con una disposizione antiperiplanare dei gruppi  $N^+$  e OAc sono buoni substrati per l'AChE, suggerendo che a livello della superficie enzimatica l'ACh dovrebbe assumere una conformazione estesa (angolo di torsione N-C - C - O =  $180^\circ$ ). Tutti i derivati esaminati hanno mostrato, invece, un'attività muscarinica troppo bassa per dedurre informazioni circa la conformazione acetilcolinica preferita a livello di recettori muscarinici.

2.8 Studio di metodi per la definizione della composizione centesimale di materiali di riferimento del Bureau Communautaire de References (BCR) della CEE.

E' stato studiato un metodo per la determinazione sequenziale di due (bromo e cloro; iodio e cloro; iodio e bromo) o di tre alogeni (I, Br e Cl) in composti organici ed in preparazioni farmaceutiche. Mediante titolazione potenziometrica e con opportuni accorgimenti tecnici sono state eseguite le analisi degli alogeni contenuti nei composti in studio come materiali di riferimento del BCR: BCR 71: N-(4-bromophenyl)-N-(2-chloro-4-nitrophenyl thiourea; BCR 73: 1-1-(4-bromophenylmethyl)-4-piperidinyl-5-chloro-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole; BCR 75: M-(4-bromo-2-iodophenyl)-N'-4-chloro-3-(trifluoromethyl-phenyl thiourea).

### 2.9. Interazioni molecolari tra sistemi di interesse biologico.

Alcuni risultati quantitativi sono stati ottenuti per le interazioni tra ioni piridinio sostituiti e strutture fenoliche di tipo catecolaminico,

E' stato condotto a termine uno studio sulle interazioni in solvente aprotico tra lo ione magnesio e le singole forme tautomeriche di monoidrossipiridine. I risultati ottenuti hanno permesso, da un punto di vista biologico, di formulare la seguente ipotesi: poichè i "siti attivi" dei sistemi biologici sono comunemente considerati come "ambienti" non acquosi, i metalli alcalini ed alcalino-terrosi possono mimare in questi sistemi il ruolo dei protoni o dell'acqua stessa.

### 2.10. Relazioni tra parametri fisici e chimico-fisici ed attività biologica di sostanze organiche di interesse farmaceutico e biologico.

E' stata osservata una correlazione lineare tra il coefficiente di attività e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua, che consente una valutazione dell'attività biologica di alcune sostanze. I coefficienti di attività di alcuni anestetici generali per inalazione presentano buone correlazioni con le rispettive pressioni anestetiche.

### 2.11. Bioequivalenza di preparazioni orali

Al fine di valutare la bioequivalenza di preparazioni orali di procainamide ne è stata misurata la biodisponibilità in vivo ed in vitro trovando una buona correlazione tra le due metodiche.

## 2.12. Tossicodipendenze e abuso di droga

Nel quadro del progetto TO.DI. è stata completata la prima fase (prospettica) di determinazione diretta della prevalenza di assuntori di morfina (oppioidi) nella fascia di popolazione dei diciottenni maschi di sette città italiane (Milano, Torino, Genova, Bologna, Firenze, Roma, Palermo). I risultati preliminari della ricerca sono stati comunicati con il RAPPORTO DROGA ITALIA 1977-1979, presentato al Ministro per la Sanità.

Verso la fine dell'anno, in accordo con le rispettive Autorità Sanitarie, è stata avviata la corrispondente seconda fase del progetto TO.DI. rivolta allo studio della fascia di popolazione (ambo i sessi, 14-45 anni) che afferrisce ai Pronto Soccorso. Tale ricerca viene svolta in due Regioni per un mese (Umbria e Friuli Venezia-Giulia).

## 2.13. Farmacologia cardiovascolare

### a) Controllo umorale e neurogeno del sistema cardiovascolare.

La tecnica degli organi superfusi, che generalmente utilizza mezzi di perfusione artificiali, è stata messa a punto per l'impiego su animali in toto e preparati perfusi con sangue. Sono state in questo modo definite le condizioni sperimentali atte a dosare nel sangue i seguenti mediatori o autacoidi: adrenalina, noradrenalina, trombossani, prostaglandine.

Sulla base di questa tecnica sono state avviate una serie di ricerche sull'adrenalino e noradrenalino-secrezione midollare nel ratto sotto stimolazione splancnica. Con l'utilizzazione dell'aorta isolata di ratto e del retto di pulcino come organi superfusi, è stato possibile calcolare l'entità della liberazione midollare in catecolamine per impulso nervoso.

In uno studio sul ruolo fisiopatologico dei metaboliti dell'acido arachidonico nella cavia sono state definite su un piano quantita-

tivo le correlazioni esistenti fra dosi di acido arachidonico somministrato e liberazione di trombossano  $A_2$  ( $TXA_2$ ). I risultati sottolineano l'esistenza di meccanismi più complessi delle semplicistiche equivalenze  $TXA_2 = \text{broncocostrizione} = \text{vasocostrizione}$ , nelle quali sia l'intervento di altri metaboliti dell'acido arachidonico, sia quello di reazioni funzionali alla broncocostrizione potrebbero giocare un ruolo non trascurabile.

Con la stessa tecnica dei vasi isolati e superfusi sono state studiate le interazioni fra controllo umorale e controllo neurogeno dei vasi, ed in particolare l'influenza del tono di base sul tipo di reattività alla stimolazione elettrica. I risultati hanno indicato l'inaspettato ruolo che il  $Ca^{++}$  sembra svolgere anche nei fenomeni di rilascio.

In rapporto ai problemi della cardioplegia per la chirurgia a cuore aperto è stato studiato l'effetto di diverse soluzioni cardioplegiche su coronarie di bue perfuse.

b) Fisiopatologia cardiopolmonare. La constatata influenza del gas nel sangue (e in particolare del  $CO_2$ ) sulla reattività bronchiale agli autacoidi brocostrittori ha portato alla messa a punto di un disegno sperimentale che utilizza il preparato cuore-polmone isolato, capace di mettere in evidenza su un piano quantitativo la dipendenza della brocostrizione da diversi autacoidi dalla  $pCO_2$  di perfusione.

Si è confermata la notevole sensibilità della brocostrizione da 5HT all'azione inibitrice del  $CO_2$ , e la relativa insensibilità della broncocostrizione da istamina.

Il preparato cuore-polmoni è stato inoltre utilizzato al fine di valutare l'efficacia delle diverse soluzioni cardioplegiche. Sul preparato è stata documentata la più intensa attività cardioplegica di soluzioni ad elevato contenuto di potassio e la più rapida ripresa funzionale cardiaca dopo cardioplegia con soluzioni contenenti magnesio e procaina.

c) Misura non invasiva dello stato di ossido-riduzione dei tessuti. La trasmittanza dei tessuti nell'infrarosso (I.R.) è stata studiata utilizzando una apparecchiatura già descritta in precedenti rapporti.

Applicata al muscolo scheletrico dell'arto posteriore del ratto in anestesia uretanica e trattato con diversi agenti vasoattivi, la tec-

nica ha permesso di documentare riproducibili e consistenti modificazioni dei diversi parametri studiati.

In particolare i cambiamenti del contenuto totale in eme misurati spettrofotometricamente nell'I.R. sono risultati paralleli alle variazioni di volume totale dell'arto misurato con la pletismografia. Cambiamenti riproducibili sono stati anche registrati nei segnali differenziali dell'I.R. e nel flusso locale.

Il programma è condotto in collaborazione con l'Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma con la III Cattedra di Neurologia dell'Università di Roma e con l'ASSORENI di Monterotondo. Esso è oggetto di un programma di ricerca sostenuto dal CNR.

#### 2.14. Farmacologia biochimica.

a) Acetilcolinesterasi e sue forme molecolari nella intossicazione da DFP nel ratto durante il periodo di sviluppo. E' stato studiato il decorso della intossicazione acuta da DFP nelle ratte gravide e l'effetto del trattamento sullo sviluppo del feto analizzando la prole alla nascita. La sensibilità al trattamento delle gestanti appare di gran lunga maggiore di quella della prole. Il DFP non induce alcuna inibizione delle attività enzimatiche nè modificazioni dei profili isoenzimatici rilevabili alla nascita nei nati da madri intossicate.

I risultati preliminari di questo studio sono stati presentati al 1<sup>st</sup> Meeting of International Society for Developmental Neuroscience.

b) Acetilcolinesterasi e sue forme molecolari nelle varie aree cerebrali del ratto, topo e cavia. Lo studio dell'AChE solubile in diverse regioni del cervello di ratto adulto non trattato, che evidenziava un contributo percentuale delle forme a basso e medio peso molecolare notevolmente superiore nell'ipotalamo rispetto a quello delle stesse forme in altre regioni, è stato esteso allo studio dell'AChE totale che evidenziava un pattern percentualmente diverso da quella solubile. Inoltre sono stati completati gli esperimenti sulle regioni cerebrali del topo e della cavia che hanno messo in evidenza un contributo percentuale delle forme a basso e medio peso molecolare nell'ipotalamo del topo simile a quello del ratto mentre tale contributo non differisce nella cavia da quello delle altre regioni.

c) Isolamento e purificazione dell'acetilcolinesterasi e sue forme molecolari. Allo scopo di confermare la validità del metodo di elettroforesi sul gel di poliacrilamide è stato messo a punto un metodo di cromatografia su colonna di gel di Sephacryl 300. L'uso di questo metodo ha permesso di dimostrare che le tre forme molecolari dell'AChE cerebrale solubile e totale corrispondono, in quantità peragonabili, a quelle separate mediante elettroforesi. Inoltre la valutazione dei pesi molecolari delle tre forme mediante cromatografia di affinità ha confermato i risultati precedentemente ottenuti usando l'elettroforesi su gel di poliacrilammide.

d) Acetilcolinesterasi cerebrale nell'intossicazione cronica da Paraoxon nel ratto adulto. Gli effetti del Paraoxon, somministrato s.c. giornalmente, sui livelli di AChE cerebrale sono stati studiati in funzione della dose, della durata del trattamento e dell'intervallo tra

l'ultimo trattamento e il sacrificio.

Alcuni dati preliminari sui profili isoenzimatici dell'AChE residua alla fine del trattamento con dosi crescenti indicano una loro marcata modificazione consistente nell'aumento delle forme molecolari leggere a spese di quelle pesanti.

L'instaurarsi della tolleranza comportamentale valutata mediante i test di avoidance behaviour sui ratti sottoposti precedentemente al training e trattati secondo lo stesso schema di sperimentazione non risulta correlato alle modificazioni delle attività enzimatiche.

e) Analisi dei meccanismi della trasmissione gangliare mediante la neurotossina naturale di *Latrodectus mactans tredecimguttatus*. Nell'anno 1980 sono stati completati gli esperimenti sull'effetto della neurotossina sulla trasmissione sinaptica nel ganglio ciliare di pollo e sul contenuto di acetilcolina nel ganglio stesso e nel mezzo di incubazione privo di ioni calcio arricchito in ioni di potassio, contenente concavalina ed in altre condizioni sperimentali.

## 2.15. Neurofarmacologia

a) Colinomimetici. Nel campo delle ricerche riguardanti l'identificazione di analogie e/o differenze tra gli effetti analgesici dei colinomimetici e delle sostanze morfino-simili, è stato eseguito uno studio sull'attività antinocicettiva di alcuni colinomimetici (tremorina, arecolina, pilocarpina, eserina). La tecnica usata è stata quella della sti-

molazione della cornea dopo instillazione congiuntivale di procaina al 2% nel coniglio. I colinomimetici presentano un'influenza sul riflesso corneale simile a quella esercitata dagli analgesici-narcotici. Gli effetti antinocicettivi dei colinomimetici sono aboliti dall'atropina ma non sono influenzati dal naloxone.

b) Enkefaline. E' stato eseguito uno studio sugli effetti della S-dermorfina sull'attività elettrica cerebrale nel coniglio e nel ratto dopo somministrazione intracerebroventricolare.

La S-dermorfina è un peptide naturale con proprietà enkefalino-simili estratto dal derma di anfibii appartenenti al genere *Phyllomedusa*, con la seguente formula: Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-SerNH<sub>2</sub>.

I risultati ottenuti indicano una notevole analogia degli effetti della dermorfina con quelli descritti per altre enkefaline sintetiche e per la stessa morfina. La ricerca sulle enkefaline è eseguita in collaborazione con l'Istituto di Farmacologia dell'Università di Roma e fa parte dei Grandi Progetti d'Ateneo.

c) Analisi neurofarmacologica dei sistemi gabaergici. Tale ricerca

ha riguardato: a) le sostanze endogene che regolano i siti recettoriali specifici delle benzodiazepine nel cervello di ratto ; b) le modificazioni che il trattamento ripetuto con diazepam durante la gravidanza può indurre nell'ontogenesi dei siti recettoriali specifici delle benzodiazepine e del GABA nel cervello del ratto ; c) il problema della solubilizzazione dei siti recettoriali del GABA e delle benzodiazepine,

d) Elettroencefalografia computerizzata nello studio del meccanismo d'azione dei farmaci. Sono state eseguite ricerche per la caratterizzazione e lo studio dei meccanismi d'azione centrale di pesticidi organofosforici e loro metaboliti (metil-parathion, paraoxon) in confronto con farmaci anticolinesterasici a breve durata d'azione (prostigmina).

I modelli sono stati studiati mediante l'uso di metodiche di elettroencefalografia computerizzata nel topo e nel coniglio.

Sono inoltre state eseguite esperienze riguardo alla caratterizzazione fisiopatologica dei traumatismi cranici lievi nel topo mediante elettroencefalografia in animali impiantati cronicamente con elettrodi corticali. Sono stati eseguiti sia studi di base per valutare la durata e il tipo di alterazioni dell'attività elettrica centrale, sia alcune esperienze con il trattamento con ormoni ipotalamici.

La ricerca fa parte dei Grandi Progetti d'Ateneo dell'Università di Roma in un progetto interdisciplinare riguardante anche fisiopatologia e clinica dei traumi cranici nell'uomo.

e) Modelli di fisiopatologia in malattie endocrine e dismetaboliche. Sono stati messi a punto e studiati alcuni modelli di fisiopatologia animale riguardanti:

a) Gli effetti e alcuni meccanismi d'azione di ormoni sessuali, maschili e femminili, sull'apparato riproduttivo di roditori impuberi.

b) L'influenza di sali solubili e insolubili di alluminio sulla attività bioelettrica e sull'equilibrio degli elettroliti nel plasma e nel sistema nervoso di animali da esperimento.

c) Le analogie e le correlazioni tra lesioni biochimiche, reperti clinici e attività elettrica cerebrale in bambini affetti da dismetabolismi proteici ereditari.

### 3. SETTORE ALIMENTI

All'attività di ricerca in questo settore hanno contribuito il Laboratorio degli Alimenti e il Laboratorio di Tossicologia.

#### 3.1. Funzioni e metabolismo dei lipidi nella dieta.

Studi compiuti negli anni passati avevano dimostrato che miscele di fosfolipidi contenenti acidi grassi dispari provocavano un precoce sviluppo comportamentale se somministrati nella dieta di ratti e topi. Poichè i fosfolipidi vengono considerati oggi tra i nutrienti essenziali si è ritenuto interessante approfondire gli studi sui problemi biochimici e tossicologico-nutrizionali collegati con i precedenti risultati estendendo le indagini ad alcuni fosfolipidi di soia e ad esteri metilici degli acidi grassi dispari. Per analizzare i fosfolipidi con maggiore esattezza si è messo a punto un metodo cromatografico su colonna applicabile anche mediante cromatografia liquida ad alta pressione.

Per studiare alcuni riflessi della composizione dei fosfolipidi sulla loro interazione con le proteine basiche della mielina, è in corso uno studio in collaborazione con il laboratorio di Biochimica dell'Università di Utrecht, che per questo lavoro ha ottenuto un contributo della Divisione Scientifica della NATO.

Gli studi sugli effetti dei fosfolipidi della dieta sullo sviluppo del sistema nervoso centrale sono stati accompagnati da uno studio che ha messo in evidenza come le stesse diete provocano variazioni anche nel corredo enzimatico dei microsomi epatici, specialmente di quello coinvolto nella desaturazione e nell'allungamento degli acidi grassi. I risultati ottenuti hanno permesso di indirizzare le ricerche sulla scle-

rosi multipla, che sono in corso in collaborazione con la Cattedra di Neurologia dell'Università di Roma, verso un'analisi dei comportamenti fosfolipidici del siero e degli eritrociti.

### 3.2. Indagini degli effetti della dieta su alcuni stati morbosi.

Sono proseguiti gli studi in collaborazione con il "Centro per la lotta alle malattie dismetaboliche e dell'arteriosclerosi" per correlare l'influenza della dieta su alcuni stati patologici, quali aterosclerosi, arteriosclerosi, infarto miocardico.

Si sta studiando su un campione di popolazione di 200 individui ad elevato rischio di malattie coronarie la correlazione tra uso di una dieta ipocolesterolemizzante e struttura delle lipoproteine HDL. In particolare è stato evidenziato che il contenuto in colesterolo delle HDL è in relazione diretta con l'incremento di acidi grassi polinsaturi presenti nella dieta. Quindi gli acidi grassi polinsaturi possono essere definiti come "fattori di protezione" per gli stati patologici menzionati.

Sono stati condotti pure degli studi in collaborazione con la IIIa Clinica Medica dell'Università di Roma sulla terapia della calcolosi biliare e sulla influenza della dieta sulla composizione dei lipidi biliari. I risultati fino ad oggi ottenuti dimostrano che i lipidi alimentari influenzano la composizione dei fosfolipidi biliari e possono quindi rappresentare un fattore di rischio per la calcolosi umana. I risultati complessivi della linea di ricerca saranno confrontati con i dati delle indagini epidemiologiche attualmente in corso.

### 3.3. Composizione degli alimenti e loro valore nutrizionale : alimenti per l'infanzia.

Linea guida delle ricerche condotte è stata quella di verificare l'adeguatezza nutrizionale degli alimenti destinati alla prima infanzia, sulla base delle indicazioni fornite dai principali comitati (SIP, ESPGAN, API) ed esperti del settore pediatrico, nazionali ed internazio-

ali. In questo ambito è stato preso in esame il problema della composizione minerale, lipidica e proteica degli "infant formula", cioè dei lattici destinati all'alimentazione del lattante sano.

Relativamente alla composizione in minerali, i dati ottenuti indicano un eccessivo apporto di fosforo, sodio, potassio e cloruri e la carenza di calcio, zinco rame e ferro, riscontrati nella maggior parte dei campioni.

Per quel che riguarda l'apporto lipidico sono state riscontrate, in alcuni campioni, carenze relative ai grammi di lipidi forniti ogni 100 Kcal e, nel quadro degli acidi grassi, frequente carenza di insaturi ed eccesso di acido palmitico.

#### 3.4. Contaminazione degli alimenti.

Sono stati estesi gli studi lungo le linee di ricerca già battute negli anni precedenti. Nel settore dei contaminanti chimici è proseguito lo studio finalizzato alla conoscenza della contaminazione da piombo, cadmio e cromo degli alimenti. Nel quadro delle indagini sulle materie prime a livello produzione nazionale, con prelievo alla fonte, è stato ultimato lo studio sulla contaminazione del riso, che fa seguito a quello già realizzato sul frumento. Sono state evidenziate concentrazioni medie di piombo e cadmio generalmente superiori a quelle riscontrate nel grano. Non sono state invece rilevate punte di elevata contaminazione.

Nel settore degli alimenti conservati è stato ultimato uno studio condotto per due anni sulla contaminazione da metalli dovuta a processi lavorativi ed a cessione da contenitori in banda stagnata. L'indagine ha evidenziato un graduale incremento della concentrazione di piombo dovuta a cessione da contenitori, generalmente poco rilevante rispetto ai contenuti iniziali.

Nel settore enologico è stata evidenziata la cessione di fibre

di amianto da parte di setti filtranti di vini.

Nel settore dei contaminanti microbiologici è stato ultimato uno studio sulla facies microbica delle paste alimentari con particolare riguardo alla presenza di germi patogeni (salmonelle - stafilococchi - *Clostridium perfringens*) evidenziando, livelli di contaminazione molto elevati

E' proseguito lo studio sulla correlazione tra presenza di muffe, muffe tossigene e micotossine delle farine ed è stata completata una indagine sul ciclo lavorativo completo del grano mettendo in evidenza il ruolo fondamentale che sotto questo profilo riveste l'acqua impiegata.

Sono state completate indagini che permettono, attraverso la ricerca diretta di alcuni enzimi sull'alimento in esame (coagulasi e termonucleasi), di evidenziare contaminazioni da stafilococco anche dopo trattamenti termici dell'alimento.

Sono stati pubblicati i risultati di un'indagine condotta su mitili prodotti nella provincia di Cagliari e che hanno condotto al riconoscimento della causa di un'epidemia di colera in Sardegna grazie all'isolamento di un ceppo di vibrio cholerae,

Sono state completate alcune indagini intese ad evidenziare eventuali modificazioni di alcuni componenti della microflora intestinale da parte di antifermentativi presenti negli alimenti.

### 3.5. Valutazione di metodologie nelle carni fresche: studio collaborativo con la CEE.

Nell'ambito della collaborazione con la CEE, nel corso del 1980 sono stati sperimentati i metodi analitici per l'estrazione del cadmio in alimenti per zootecnica.

### 3.6. Inibitori proteici dell'alfa-amilasi.

Proseguendo gli studi precedentemente intrapresi è stato studiato l'effetto degli inibitori amilasici sulla crescita del pulcino è stato studiato di recente utilizzando inibitori incapsulati in microgranuli di cellulosa resistente all'azione della pepsina dell'ingluvie. L'aggiunta di tali microgranuli alla dieta di pulcini fin dal primo giorno di vita causò una diminuzione della crescita evidente già dalla prima settimana di trattamento. Dopo circa quattro settimane, tuttavia, la velocità di crescita dei pulcini divenne identica a quella degli animali non trattati; indicando un adattamento dell'animale alla presenza di inibitori amilasici nella dieta. Tale adattamento fu, in realtà, solo apparente poiché gli animali trattati presentavano ipertrofia ed incipiente degenerazione del pancreas. Nel 1981 saranno continuati gli studi sugli inibitori proteici dell'alfa-amilasi allo scopo di definire meglio l'eterogeneità degli inibitori presenti nella cariosside di frumento e di acquisire alcune ulteriori conoscenze sul meccanismo dell'interazione amilasi-inibitori. Ciò sarà fatto, in particolare, studiando l'intera-

zione inibitori-amilasi da Octopus vulgaris e da alcuni ceppi di Bacillus subtilis che producono un'amilasi che, a differenza di quella commerciale, è inibita dagli inibitori in questione. Inoltre, sarà effettuato uno studio di tossicità sub-cronica somministrando nel ratto gli inibitori in questione.

#### 4. SETTORE AMBIENTE.

Nell'ambito della promozione e salvaguardia della salubrità dell'igiene dell'ambiente, l'Istituto ha svolto anche nel 1980 una attività di ricerca e di indagine, sia sviluppando programmi già iniziati negli anni precedenti e sia nuovi programmi che sono stati riconosciuti validi ed in armonia con gli indirizzi contenuti nel Piano Sanitario Nazionale.

Tali ricerche ed indagini sono rivolte alla identificazione e valutazione di sostanze tossiche comunque presenti nell'ambiente di vita e di lavoro; alla identificazione e quantizzazione degli inquinamenti dell'aria, dell'acqua e del suolo, di natura chimica, fisica e microbiologica, all'inquinamento acustico, alla protezione delle popolazioni dai rischi derivanti dall'uso delle radiazioni ionizzanti e non ionizzanti. Nel campo riguardante gli ambienti di lavoro, le ricerche e le indagini si riferiscono alla protezione dei lavoratori dalle esalazioni di tossici industriali e da sostanze particolari di corrente impiego nel mondo delle diverse tecnologie.

All'attività di ricerca in questo settore hanno contribuito il Laboratorio di Tossicologia, il Laboratorio di Igiene del Territorio, il Laboratorio di Igiene del Lavoro e il Laboratorio delle Radiazioni.

#### 4.1. Metodologie per la valutazione dell'attività mutagena di composti chimici.

Nell'ambito di un' programma internazionale CEE per lo studio della mutagenesi chimica ambientale sono continuate le ricerche secondo le linee principali già presentate nella relazione del 1979:

a) Tests di mutagenesi con microorganismi: a) è stata saggiata con risultati positivi la mutagenicità di tinture per capelli contenenti p-fenilendiammina, resorcinolo e aminofenoli applicando varie tecniche di attivazione metabolica sia in vitro (microsomi) che in vivo (test delle urine); b) la capacità di indurre mutazioni puntiformi di varie sostanze chimiche appartenenti alla classe degli idrocarburi alifatici alogenati è stata analizzata in uno studio comparativo con diversi tests genetici in diversi microorganismi procarioti ed eucarioti c) in Aspergillus è stata messa a punto una nuova tecnica (Growth mediated assay) per permettere anche in questo microorganismo la identificazione di carcinogeni e mutageni indiretti ; d) sono stati completati gli studi relativi all'applicazione del fenomeno della co-mutazione in Streptomyces per l'isolamento di mutanti incapaci di ridurre il nitrato e mutanti termosensibili.

b) Studi di non-disgiunzione. Nell'ambito degli studi sulla non-disgiunzione in Aspergillus è stata studiata la capacità di indurre tale fenomeno da parte di sostanze chimiche che alterano la membrana inibendo la sintesi degli steroli: gli antibiotici polienici Miconazolo e

Econazolo, usati in preparati farmaceutici e Phenarimol, Ancymidol e Triforine usati come fungicidi in agricoltura, sono risultati essere agenti non-disgiunzionali ; il meccanismo di azione di tali sostanze sembra tuttavia essere diverso da una interazione primaria col DNA o con i cromosomi.

c) Tests a livello cellulare a) gli antiparassitari Diallate, Triallate, Sulfallate, Dichlorvos e Trichlorphon sono risultati capaci di indurre sintesi non programmata del DNA (UDS), indicando una capacità di alterare il patrimonio genetico ; b) in colture di hamster cinese si è conclusa la sperimentazione sulla mutagenicità di 2 di questi pesticidi (Dichlorvos e Trichlorphon) e di un loro metabolita attivo (Dichloroacetaldehyde) con risultati negativi ; c) è stata avviata la messa a punto di un sistema sperimentale per la rilevazione di danni al DNA in linfociti umani trattati in vitro con radiazione UV e con agenti chimici mutageni; d) difficoltà strutturali (efficienza dello stabilario) hanno determinato complicazioni non ancora risolte per i tentativi di standardizzazione di tests a breve e a medio termine, per la trasformazione in vitro.

#### 4.2. Metabolismo comparato di sostanze tossiche in specie animali e vegetali.

Questo programma è in corso di svolgimento nell'ambito della convenzione CNR relativa al Progetto finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente". Tale programma tende ad acquisire una adeguata base conoscitiva del metabolismo delle sostanze xenobiotiche in organismi

animali e vegetali che vengono utilizzati come indicatori biologici per la previsione del danno che le sostanze chimiche industriali possono arrecare all'ambiente (VI Modifica della Direttiva CEE 67/548, approvata il 18 settembre 1979).

Nel periodo intercorso dall'inizio del programma è stata verificata la possibilità di applicare la metodica, già standardizzata per il fegato di ratto, per l'ottenimento di frazioni microsomiali da epatociti di quaglia e di trota, da ghiandola digestiva di mitilo e da omogenato di Daphnia. Attraverso la valutazione di marcatori biochimici della contaminazione da parte di altri organelli sub-cellulari e di attività enzimatiche microsomiali, è stato possibile dimostrare che tale metodica può essere applicata alla trota e alla quaglia, mentre per il mitilo e la Daphnia è necessario apportare modifiche tendenti a stabilizzare e proteggere il sistema di trasporto di elettroni microsomiali e le attività enzimatiche monossigenasiche associate al citocromo P-450. Si è proceduto, inoltre, alla caratterizzazione funzionale delle frazioni microsomiali isolate dai suddetti organismi. I risultati finora ottenuti dimostrano la presenza, anche se a livelli generalmente inferiori rispetto al ratto, di numerose attività enzimatiche farmacometabolizzanti in trota, quaglia e mitilo.

#### 4.3. Diossina (TCDD).

E' stata pubblicata nel 1980 una serie di 8 lavori contenenti una completa descrizione e analisi critica dello stato di contaminazione da diossina (TCDD) dell'ambiente di Seveso colpita dall'incidente ICME-SA.

Questi lavori riguardano le metodologie analitiche per il dosaggio della TCDD in diverse matrici ambientali, la distribuzione superficiale e in profondità della TCDD nel suolo e

la presenza nelle particelle atmosferiche, la persistenza della TCDD nell'ambiente e la distribuzione della TCDD in tessuti di vegetali e animali della zona contaminata. Questa serie di lavori fornisce la più esauriente e completa analisi dell'impatto ambientale dell'incidente ICMESA prodottosi nel luglio 1976.

#### 4.4. Indagini tossicologiche su derivati del trifluorotoluene.

Circa due anni fa fu indentificato un rilevante inquinamento delle acque da nitro derivati dell'alfa,alfa,alfa-trifluorotoluene in località Trissino, provincia di Vincenza. Nei campioni di acqua prelevati dalle zone inquinate furono dosati, mediante gas cromatografia e spettrometria di massa livelli di 4-cloro-alfa,alfa,alfa,-trifluoro-toluene (CTT), 3-nitro, 4-cloro-alfa,alfa,alfa,-trifluoro-toluene (NCTT) e 3,5-dinitro-4-cloro--alfa,alfa,alfa-trifluoro-toluene (DNCTT) in intervalli compresi fra 0.05 e 90 ug/l, 0.6 e 450 ug/l e 0.7 e 56 ug/l rispettivamente. A causa della carenza di informazioni tossicologiche specifiche su tali composti è stato necessario effettuare alcune ricerche tossicologiche in vivo. In particolare sono stati studiati il p-cloro-trifluoro-toluene (CTT); il 3-nitro-4-cloro-trifluoro-toluene ed il 3,5-dinitro-4-cloro-trifluoro-toluene (DNCTT), determinando la  $DL_{50}$  che è risultata essere per il ratto rispettivamente di oltre 1500 mg/Kg peso corporeo, circa 1000 mg/Kg peso vivo e circa 700 mg/Kg. Contemporaneamente sono state osservate le lesioni anatomoistopatologiche provocate dalla somministrazione di una singola dose e la reversibilità delle lesioni stesse 15 giorni dopo il trattamento. Per questi composti era stata ipotizzata un'attività metaemoglobinizzante; la sperimentazione condotta non ha confermato tale ipotesi ed attualmente

sono in corso altre esperienze tendenti a confermare, in vivo una seconda ipotesi che attribuisce ai prodotti in questione la capacità di interferire nei processi di respirazione mitocondriale. Tali ricerche hanno portato a studiare nel ratto gli effetti meta-emoglobinizzanti del nitrato di sodio e del p-dinitrobenzene. Scopo delle ricerche in corso è quello di definire un livello senza effetto per queste sostanze, quale risulta da sperimentazione a medio termine. Attualmente è in corso di svolgimento una sperimentazione di tossicità subcronica (28 giorni) da effettuarsi con il 3,5-dinitro-4-cloro-trifluoro-toluene sul ratto per via orale.

#### 4.5. Antiparassitari.

L'attività di ricerca ha interessato l'esame delle caratteristiche dei principi attivi antiparassitari, delle impurezze significative presenti in alcuni di essi, allo scopo di raccogliere elementi che permettessero di valutarne il significato e l'importanza sanitaria. Il lavoro sperimentale ha riguardato soprattutto le impurezze di TCDD (Tetracloro dibenzo-p-diossina) e di ETU (Etilene-tio-urea).

E' stato continuato il lavoro per lo studio e la messa a punto di metodi analitici per il controllo sia dei preparati commerciali antiparassitari (composti attivi ed impurezze), sia per la determinazione dei residui o prodotti di degradazione ,

Lo sviluppo di tali argomenti si è reso necessario ed urgente anche a seguito dell'emanazione di norme legislative recenti (Ordinanza ministeriale che fissa i limiti di tolleranza dei residui di antiparassitari in alimenti diversi, del 1979; regolamentazione dei prodotti che potrebbero contenere TCDD, del novembre 1978, ecc.). In tale ambito sono state sviluppate tecniche di tipo gascromatografico, cromatografia liqui-

do/liquido, gascromatografia/spettrometria di massa ecc. per l'individuazione dei composti o metaboliti in substrati anche biologici.

E' stato pure avviato un lavoro sulle caratteristiche di comportamento e tossicologiche di composti tetracloroazobenzenici (TCAB e TCAOB), composti altamente pericolosi che possono essere contenuti in taluni erbicidi o possono formarsi da essi per metabolismo ambientale. Sono stati raccolti elementi su tali composti ed iniziate alcune ricerche. I composti stessi sono stati sintetizzati, purificati ed identificati, data la loro indisponibilità sul mercato, nella prospettiva di utilizzarli come standard per le prove di tipo diverso programmate.

E' continuata la collaborazione al programma CEE "Mutagenicità dei pesticidi come prodotti puri e dopo metabolismo nelle piante" e che come conclusione ha portato ad utili acquisizioni, oggetto di specifiche relazioni e note.

Sono stati esaminati 26 campioni di prodotti di erboristeria (menta, fiori d'arancio, lavanda, salvia, rosmarino, tiglio, verbena, anice, eufrasia, melitoto, melissa, finocchio, timo e tisane diverse), prelevate dal NAS in varie zone d'Italia, allo scopo di accertare il tipo e la entità della eventuale contaminazione da antiparassitari e di ricavare elementi per valutare il significato di tale contaminazione. Con ciò si è voluto in qualche modo anticipare la raccolta di elementi su prodotti finora non considerati per questi aspetti e di sempre più larga diffusione, anche nella visione di una eventuale regolamentazione del settore.

In collaborazione con l'Osservatorio per le malattie delle piante di Bologna, che ha effettuato i trattamenti sperimentali su campo e ha curato il prelievo dei campioni a tempi scalari, è stata eseguita una ricerca tendente ad accertare quale entità avessero i residui di diftlocarbammati utilizzati nelle normali e corrette condizioni di impiego (dosi e modalità fitoiatricamente efficaci), al fine di verificare la rispondenza o meno di tale residuo con quello legalmente ammesso.

I trattamenti sono stati effettuati con formulazioni a base di Mancozeb, Vandozeb, Zineb, Propineb e Metiram su colture di scarola, lattuga e fagiolini, che sono state raccolte dopo 10, 20 e 30 giorni dal trattamento, per un totale di 48 campioni. Ciò anche allo scopo di avere elementi di valutazione obiettivi e corretti relativi a tali composti

sui quali si è accentrata ultimamente l'attenzione degli ambienti scientifici e che quasi dovunque ha portato a conseguenti correzioni legislative, talune ancora da approfondire. In parallelo è stata eseguita una analoga sperimentazione su campioni di prodotti ortofrutticoli prelevati dal mercato (mele, lattuga, finocchi, carciofi, zucchine, bieta, cetrioli, prugne, pomodori, sedani, peperoni, melanzane e uva) per un totale di 80 campioni, al fine di poter rilevare le quantità di residuo di ditiocarbammati e compararle con quelle attualmente ammesse. Un rapporto sul complesso della sperimentazione, con le relative ipotesi di valutazione sanitaria è in corso di stesura.

Una ricerca analoga, ed avente analoghi scopi, ha riguardato il composto 3-(3,5-diclorofenil-N-isopropil-2,4-diossimidazolidinil-carbossiamide, recentemente introdotto come fungicida, in particolare della vite. La sperimentazione, effettuata tramite la Dir.Gen.Ig.Alim. e Nutrizione del Ministero della Sanità ed eseguita in collaborazione con gli Osservatori per le malattie delle piante di Torino e Bari, ha riguardato 34 campioni di uva, trattati e prelevati in condizioni diverse.

Tra le ricerche espletate vanno comprese pure quelle relative alla collaborazione, già in atto da più anni, con 25 Laboratori provinciali di igiene e profilassi e concernenti la sperimentazione collegiale di metodi per il controllo dei residui di pesticidi.

#### 4.6. Inventario nazionale delle sostanze chimiche

Al fini dello studio di fondo delle sostanze chimiche, in stretta correlazione con quanto stabilito dall'art. 9 della legge n. 833/78 e con il movimento scientifico internazionale (UNEP, ILO, OMS,

OCSE, CEE), è stata avviata la realizzazione dell'Inventario nazionale delle sostanze chimiche, inteso non come una delle banche dati, ma piuttosto come una sintesi delle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche delle sostanze chimiche, finalizzata all'evidenziazione degli elementi salienti dal punto di vista sanitario ed alla valutazione del rischio.

In tale linea è stata espletata, per conto della CEE, una convenzione relativa allo studio delle priorità chimico-fisiche, tossicologiche e di rischio di 200 sostanze attive antiparassitarie, pervenendo per ciascuna di esse alla definizione di apposita scheda monografica (in lingua inglese) ed alla proposta di classificazione di pericolo. Lo studio è stato assunto come documento ufficiale della CEE e trasmesso agli Organi scientifici dei Paesi membri per le eventuali osservazioni critiche e come base dei lavori del Comitato di adeguamento al progresso tecnico. E' stata poi avviata la realizzazione di un'ulteriore convenzione CEE per altre 320 sostanze attive antiparassitarie.

Parimenti, per circa 100 sostanze chimiche coinvolte nell'incendio dello stabilimento Montedison-DIAG di Massa sono state elaborate schede finalizzate alla valutazione di rischio.

Sono state, inoltre, elaborate rassegne critiche dei dati tossicologici per i seguenti solventi: acetone, glicerolo, propano-1-olo, propano-2-olo, butan-1-olo, butan-2-olo, t-butanolo, benzil alcool, propano-1, 2-diolo, p-dicloro-benzene.

Sul piano sperimentale è stata effettuata in collaborazione con l'Istituto Regina Elena, una sperimentazione analitica sulla persistenza dell'ossido di etilene in materiali diversi sottoposti negli ospedali a processi di sterilizzazione con tale gas tossico, pervenendo a complete proposte sul metodo analitico, sui tempi e le condizioni di dissipazione dei residui, sui limiti tollerabili.

Sono stati inoltre elaborati e sperimentati criteri e metodi di prova su biomateriali in plastica, quali sonde gastriche, respiratorie,

cateteri uretrali e di drenaggio, ai fini della regolamentazione come presidi medico-chirurgici. Infine sono stati definiti metodi ancor più sensibili (0.01 ppm) per la determinazione del cloruro di vinile monomero negli alimenti.

#### 4.7. Inquinamento atmosferico.

Nel corso dell'anno 1980 sono state sviluppate le ricerche già iniziate nell'anno precedente riguardanti lo studio della qualità della aria e delle interazioni tra i diversi inquinanti presenti nell'aria stessa, i cui risultati sono dati in bibliografia e dimostrano come tale interazione sia un fenomeno di sensibile importanza e da tenersi presente nel caso che nella stessa zona siano presenti emissioni di diverse natura ma capaci di interagire tra loro.

Sono proseguite anche le ricerche metodologiche riguardanti i metodi di rilevamento degli inquinanti atmosferici con particolare riguardo al biossido di zolfo nell'area urbana, tecniche di prelievo di aerosol per la determinazione del TCDD, la determinazione delle polveri sospese ed il confronto delle metodiche con quelle usate nei paesi delle CEE.

#### 4.8. Inquinamento marino

Le ricerche e dosaggio di inquinanti chimici nelle acque co-

stiere del litorale laziale hanno confermato la correlazione tra stato di inquinamento costiero per apporto di sostanze inquinanti da corsi di acqua superficiali e condizioni meteomarine con pubblicazione nel rapporto annuale dell'OMS concernente il programma Med VII.

Per l'inquinamento microbiologico sono state messe a punto tecniche analitiche che dimostrano la validità e la correlazione tra inquinamento dell'acqua marina e sedimenti marini. Le analisi sono state condotte nella zona di Bacali e Coroglio nel golfo di Pozzuoli con controllo sistematico di campioni di mitili.

#### 4.9. Inquinamento del suolo.

In questo campo sono state svolte delle ricerche sulla possibilità di trattare mediante filtrazione e combinazione con compost proveniente dai rifiuti solidi urbani, i liquami degli allevamenti suinicoli intensivi.

Le ricerche hanno confermato la validità della tecnica proposta, con sensibile beneficio nel piano della fattibilità del disinquinamento delle acque reflue degli allevamenti sopramenzionati.

Sono state anche sviluppate ricerche sui modelli matematico-statistici per la valutazione delle sostanze chimiche contaminanti nell'ambiente con particolare riguardo allo studio dei trends temporali dei livelli di TCDD nel territorio contaminato presso Seveso. I risultati dei lavori pongono in evidenza che la degradazione e la mobilità di queste sostanze nel tempo dipende oltreché da cause naturali dai trattamenti agricoli.

Infine sono state anche svolte indagini sugli effetti dei rifiuti solidi nei terreni destinati a discariche controllate.

#### 4.10. Inquinamento acustico

Le ricerche in questo settore si riferiscono ad uno studio analitico per ricerche su modelli matematici atti a fornire i dati previsionali sull'inquinamento acustico nelle aree urbane in base ai contributi dei singoli eventi che concorrono alla genesi della rumorosità ambientale.

Nel 1980 sono terminate le indagini sperimentali che hanno confermato la sufficiente attendibilità del metodo analitico previsionale proposto ed i cui dati saranno pubblicati dopo la loro elaborazione. Il lavoro rappresenta un utile strumento di pianificazione del traffico veicolare nei centri urbani ai fini del controllo dell'inquinamento acustico a tutela igienico-sanitaria della popolazione esposta.

#### 4.11. Ambiente di lavoro.

Sono state sviluppate ricerche nel settore delle metodologie epidemiologiche per lo studio dei rischi specifici, dimostrando un aumento della patologia respiratoria nei lavoratori di questo settore esposti a calore radiante ed a fluoruri e ceramiche.

Sono stati effettuati inoltre studi tossicologici sperimentali in rapporto con le polineuropatie nell'industria calzaturiera e studi sulle forme molecolari delle colinesterasi ematiche, quadro normale ed effetti di derivati organofosforici, anche in rapporto alla esposizione professionale.

Sono stati anche sviluppati gli studi sui rischi di danno alla salute da inquinamenti chimici ed in particolare da olii minerali e sulle procedure per il campionamento, la preparazione del campione ed il riconoscimento e dosaggio delle fibre di asbesto. Tale studio ha fornito i primi dati ambientali italiani di inquinamento da asbesto nell'ambito ferroviario ed in ambienti dove si lavora e si manipola l'amianto.

#### 4.12. Interazioni di particelle.

Questo programma è costituito da una serie di ricerche di base nel campo della fisica nucleare e subnucleare. Tali ricerche sono svolte in collaborazione e nell'ambito della Sezione Sanità dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN). Per far fronte alle esigenze di calcolo scientifico delle ricerche è stato completato nel corso del 1980 l'allacciamento di un minielaboratore PDP 11/34 del Laboratorio a una rete di altri minicomputer collegati attraverso linee telefoniche e situati presso i Laboratori Nazionali di Frascati (LNF) dell'INFN e presso l'Istituto di Fisica dell'Università di Roma. Tale rete consente ai ricercatori dell'Istituto il collegamento con i centri di calcolo interfaccità del CINECA (Bologna), dell'UNIVAC (Roma) e del CNUCE (Pisa).

a) Studio della struttura dei nuclei attraverso interazioni elettromagnetiche. Tale linea di ricerca comprende esperimenti effettuati con fascio di elettroni (acceleratore lineare di elettroni da 600 MeV di Saclay, Francia) e con fascio (fascio Ladon, Laboratori Nazionali dell'INFN

di Frascati).

I primi sono effettuati in collaborazione con ricercatori dei Laboratori Nazionali dell'INFN di Frascati, con ricercatori del Commissariat à l'Energie Atomique del CEN di Saclay e con ricercatori singoli di altri centri esteri (IKO, Olanda, Illinois University e Louisiana University, USA) e vertono sullo studio dei sistemi nucleari a pochi nucleoni e sui nuclei medio leggeri.

I risultati di tali esperimenti sono a diversa fase di elaborazione e l'attività di tale settore continuerà ancora per vari anni. E' in fase di avanzata realizzazione un programma di analisi delle misure delle esperienze (e,e'p) che può essere immesso su un calcolatore IBM.

Nel 1980 sono terminate le misure relative allo studio del deuterio e dell'<sup>3</sup>He mediante diffusione quasi - elastica di elettroni, con rivelazione in coincidenza dei protoni emessi dal nucleo e degli elettroni diffusi, ed è continuato lo studio sperimentale della reazione inclusiva con rivelazione dei soli elettroni diffusi. Per quanto attiene all'attività con il fascio Ladon, nel 1980 è terminato lo studio delle caratteristiche del fascio ed è continuato lo studio della fotodisintegrazione del deuterio con un sistema di rivelazione in coincidenza dei protoni e dei neutroni emessi.

b) Studio delle interazioni di particelle elementari ad alte energie. Nel 1980, completata la costruzione dell'apparato sperimentale (un grande calorimetro, del costo di alcuni miliardi), è continuata la raccolta dei dati sperimentali.

Dall'analisi, attualmente in corso sia al CERN sia a Roma, sono state già ottenute informazioni importanti sulla interazione di particelle neutre con la materia e sulla polarizzazione dei mesoni mu.

L'esperimento utilizza il fascio di particelle prodotto dal grande acceleratore SPS del CERN ed è condotto in collaborazione con ricercatori provenienti dal CERN e da laboratori italiani, tedeschi e sovietici.

c) Partecipazione alla progettazione di nuovi standard internazionali per l'elaborazione dei dati raccolti negli esperimenti di fisica delle alte energie. Nel corso del 1980 è continuata la partecipazione ai lavori del gruppo di studio europeo Advanced System Study Group (ASSG) dell'European Standard on Nuclear Electronics (Comitato Esone), che ha collaborato con l'analogo gruppo FSDG del Comitato NIM americano.

Questi studi si sono concretizzati con l'emanazione da parte del comitato NIM delle specifiche del nuovo standard internazionale per l'acquisizione veloce dei dati sperimentali, chiamato FASTBUS. In relazione a tali attività l'Istituto è stato chiamato a far parte del massimo organo di coordinamento tecnico dell'ESONE (il Technical Coordination Committee), e in tale sede ha portato il contributo italiano a varie altre attività, tra le quali riveste particolare rilievo la prossima emanazione di un nuovo standard europeo di elaborazione parallela di dati.

d) Studi teorici sulla struttura dei nuclei. Nel 1980 è continuata l'attività riguardante in particolare:

- 1) studio dei sistemi di molti corpi;
- 2) interazioni di particelle di energia intermedia con sistemi di tre nucleoni.

Nell'ambito del primo tema sono state messe a punto nuove tecniche variazionali per il calcolo delle proprietà dei sistemi contenenti un numero infinito (materia nucleare, elio liquido, gas di elettroni, ecc.) e finito (nuclei atomici) di particelle interagenti. In

particolare, è iniziato lo studio di stati "insoliti" della materia nucleare consistenti in fluttuazioni di densità e di strutture ordinate di spin e isospin.

L'attività del secondo campo di ricerca ha visto da una parte il proseguimento dei calcoli delle sezioni d'urto di diffusione di elettroni ed adroni su  $^3\text{H}$  e  $^3\text{He}$  usando funzioni d'onda per il sistema di tre nucleoni ottenute da una accurata soluzione dell'equazione non relativistica di Schrodinger contenente interazioni realistiche nucleone-nucleoni e, dall'altra, l'inizio di un approccio completamente nuovo al problema di tre e quattro nucleoni interagenti basato su una unificazione delle ipotesi che sono alla base del metodo di Jastrow e del metodo variazionale su basi di oscillatore armonico.

#### 4.13. Transizioni di fase.

a) Superconduttività e fenomeni critici. Nel corso del 1980 la ricerca in superconduttività è stata rivolta allo studio del comportamento elettromagnetico di film superconduttivi di stagno in campi magnetici perpendicolari alla superficie dei campioni.

Lo scopo principale del lavoro è stato quello di studiare il passaggio del comportamento caratteristico dei film spessi mediante un metodo di misura di tipo differenziale che fa uso di sistemi a sensibilità di fase e che permette di misurare la derivata prima della resistenza superficiale del campione in funzione del campo magnetico.

In particolare è stato determinato l'andamento del campo critico perpendicolare in funzione dello spessore.

E' stata anche avviata nel corso del 1980 un'attività teorica nel settore della fisica delle transizioni di fase e dei fenomeni critici ed è stato portato a termine il primo passo di questa attività, consistente nell'acquisizione delle tecniche teoriche più avanzate del settore.

b) Cristalli liquidi. Sono state effettuate ulteriori misure di NMR, con alta risoluzione, in collaborazione con l'Accademia delle Scienze di Budapest, su cristalli liquidi nematici in fase isotropica. E' stata studiata la dipendenza dalla frequenza e dalla temperatura sia dei tempi di rilassamento che dei fattori caratteristici dell'effetto Overhauser. I dati permettono di chiarire la presenza di moti molecolari lenti e di una distribuzione di tempi di correlazione che consente di superare molti dei problemi interpretativi sul comportamento dinamico dei cristalli liquidi. I dati, inoltre, suggeriscono che l'interazione intermolecolare tra le molecole sia responsabile della formazione della fase "cristallo liquido" attraverso una interazione cooperativa che coinvolge più molecole. E' stata, inoltre, messa a punto la tecnica di "spin-label" che permette una misura dell'ordinamento in fase nematica.

#### 4.14. Proprietà ottiche dei solidi

a) Spettroscopia ottica dei solidi. Nel 1980 è stato portato a compimento uno studio completo sugli spettri di termo assorbimento di composti misti lamellari  $\text{GaSe}_{1-x}^S$  (con  $0 < x < 1$ , a passi di 0,1), cresciuti sia in fase vapore che con il metodo Bridgmann, trovando una soddisfacente interpretazione fisica dei dati ottenuti.

E' anche continuata la collaborazione con la facoltà di Scienze dell'Università di Stato dell'Azerbaijan (URSS), completando i lavori sulla interdipendenza esistente fra proprietà semiconduttive e caratteristiche ferroelettriche del composto SbSI. Lo studio è stato effettuato servendosi di tecniche di spettroscopia a modulazione.

b) Proprietà ottiche di film sottili. L'attività del 1980 si è articolata in due parti, la prima delle quali, di carattere sperimentale, è rivolta allo studio della dipendenza delle costanti ottiche di un film sottile metallico, ottenuto per evaporazione, dai parametri controllabili durante il processo di deposizione. Per queste misure sono state notevolmente migliorate le condizioni di vuoto e le metodologie per la misura dello spessore del film e per il controllo della velocità di deposizione. E' contemporaneamente iniziato lo studio di un metodo di calcolo delle costanti ottiche di strutture sottili assorbenti utilizzando misure di riflettanza e trasmittanza a incidenza normale e sfruttando un'analisi comparativa, attraverso procedure numeriche, dei principali metodi indicati in letteratura.

La seconda parte dell'attività, di carattere teorico, è stata dedicata ai film sottili inomogenei non assorbenti, portando a termine uno studio sull'antiriflessione di film con indice di rifrazione a profilo esponenziale. Con un semplice metodo di approssimazione sono state risolte le equazioni trascendenti che esprimono le condizioni di antiriflettanza e si è indicata la utilizzazione delle soluzioni per la sintesi di film ottici con bassa riflessione su larga banda spettrale. Tale attività è stata svolta in collaborazione con l'Università dell'Aquila.

#### 4.15. Metrologia delle radiazioni

Nel quadro della convenzione ISS-INFN e in collaborazione con l'Università di Ferrara, è proseguito nel 1980 il programma di metrologia delle radiazioni ionizzanti, che prevede la realizzazione e la conservazione di campioni primari delle grandezze fisiche utili nel campo delle radiazioni, in particolare per quanto riguarda il loro uso in campo medico. In particolare l'apparato per la realizzazione dell'unità di esposizione alle medie energie è stato dotato di opportune attrezzature in modo da permettere l'automatizzazione delle procedure di misura gestite da un minicalcolatore.

Lo standard primario per le basse energie è già in fase di realizzazione ed anche per questo settore sono previste, ed in parte già realizzate, adeguate attrezzature per la completa automazione delle misure. Di particolare interesse è stata la progettazione e la realizzazione della camera monitor ad aria libera per il controllo dell'emissione del tubo a raggi X di basse energie, della quale si sta procedendo allo studio delle caratteristiche di funzionamento. Per quanto riguarda lo studio delle radiazioni di bassa energia è stato anche acquistato un rivelatore a germanio puro, collegato con un multicanale ed interfacciato con il minicalcolatore per l'analisi automatica dello spettro del fascio emesso dal tubo e per ricerche di spettrometria X. Tramite una sorgente di  $^{241}\text{Am}$  montata su un supporto che consente spostamenti micrometrici in due direzioni ortogonali, è stato effettuato un controllo sulla omogeneità di risposta del cristallo di germanio su una superficie di  $7 \times 7 \text{ mm}^2$  di area, che ha dato ottimi risultati.

Accanto alle attività di metrologia primaria, sono proseguite nel 1980 le ricerche su nuovi tipi di rivelatori a termoluminescenza, per

mettere in evidenza pregi e difetti a breve e lungo termine.

Nell'ambito della dosimetria della radiazione UV sono state studiate le caratteristiche di emissione di alcune sorgenti di larga diffusione allo scopo di valutare l'entità del rischio che il loro impiego comporta. In particolare sono state effettuate, con apparecchiature standard, misure di distribuzione spaziale dell'irradianza efficace da attribuire alle diverse zone di emissione spettrale, tenendo conto dei valori di efficacia relativa fissati dall'ACGIH.

## PROGRAMMA DI ATTIVITA' FUTURA

L'attività di ricerca per il 1982, già in larga parte descritta nelle sezioni di questa relazione che si riferiscono al consuntivo della attività di ricerca e di intervento, sarà costituita dal naturale proseguimento ed ampliamento dei programmi iniziati negli anni precedenti, ma dipenderà anche dalla nuova struttura che l'Istituto assumerà nel corso del 1981 di fronte ai recenti compiti ad esso affidati.

Tutti questi compiti da un lato richiedono una ampia disponibilità di specifiche competenze nelle diverse discipline afferenti ai vari settori di intervento, dall'altro presuppongono in queste competenze una elevata qualità professionale, a garanzia dell'autonomia scientifica che l'art. 9 della legge istitutiva del SSN esplicitamente riconosce allo Istituto stesso. Le prime saranno identificate nel progetto di ristrutturazione attraverso la definizione dei diversi settori di intervento e delle relative attribuzioni, la seconda potrà essere assicurata solo attraverso lo sviluppo e il consolidamento a medio e lungo termine delle basi necessarie a una vivace ed organica attività di ricerca sui principali problemi sanitari, in particolare su quelli emergenti e su quelli in rapida evoluzione.

Una serie fondamentale di indirizzi dell'attività di ricerca e di intervento dovranno essere rivolti:

- allo sviluppo e alla valutazione delle conoscenze scientifiche rilevanti ai fini del miglioramento della sanità pubblica e al benessere dei cittadini;
- allo studio, anche mediante modelli biologici o ambientali -- caratterizzati da diverso livello di integrazione -- delle cause remote e prossime e dei meccanismi delle principali forme di patologia;

- alla analisi delle rilevanze, dei diversi modelli, biologici o ambientali, per l'elaborazione di adeguate strategie di prevenzione primaria;
- alla valutazione dei rischi connessi con la produzione di energia e con l'uso di sostanze chimiche;
- alla elaborazione, valutazione, standardizzazione e controllo delle metodologie e dei principali strumenti utili alla prevenzione secondaria, alla diagnosi e alla terapia delle malattie;
- alla identificazione di criteri di valutazione dello stato di salute della popolazione;
- alla verifica del modus operandi delle strutture che agiscono nello ambito del SSN al fine di un corretto sviluppo dei modelli di adeguamento e razionalizzazione dei settori operativi;
- allo studio dei modelli di informazione e di intervento sui diversi settori di competenza dello Stato per i quali è prevista la consulenza dell'ISS.

Sul piano operativo, le strutture e l'organizzazione dell'Istituto debbono assicurare la più ampia integrazione con gli organi centrali e periferici del SSN, il cui sviluppo può trarre stimolo da questo intervento che non può tuttavia assumere un carattere episodicamente sostitutivo di funzioni periferiche deficitarie.

Sul piano strutturale, si dovranno prevedere due livelli di aggregazione delle competenze. Un primo livello è costituito dai laboratori formati secondo un criterio di omogeneità culturale onde garantire attività di ricerca e interventi operativi e consultivi professionalmente qualificati nei diversi settori di competenza. Tenuto conto delle attribuzioni, nel loro organigramma i laboratori non dovranno superare quelle dimensioni critiche oltre le quali risulterebbe aleatoria una loro agevole conduzione sulla base della collegialità di programmazione e di valutazione già sancita dalle precedenti normative.

Una volta definiti i criteri strutturali e operativi validi per i laboratori, sarà necessario individuare un secondo livello di aggrega-

zione identificando diversi settori di intervento nell'ambito dei quali potranno, in alcuni casi, essere attivi più laboratori.

In tali settori l'ampiezza delle attribuzioni di ordine generale, applicativo e normativo, tutte riferentesi ad una comune base culturale e metodologica, non potranno conciliarsi col criterio della agilità di gestione se non attraverso la costituzione, sotto una denominazione simile o correlata, di più laboratori destinati ad operare in stretta collaborazione e interazione fornendo le necessarie competenze per la ricerca e gli interventi consultivi e operativi nei problemi specifici del settore.

Ciò consentirà anche il raggruppamento di carattere programmatico dei diversi laboratori che operano in materie affini: questo raggruppamento dovrà perfezionare il meccanismo di interazione fra i laboratori sino a portare, attraverso una prima fase di orientamento, all'istituzionalizzazione di questi rapporti e, in definitiva, a una organizzazione dipartimentale.

Gli interventi nei quali si articola l'attività dell'ISS sono caratterizzati da finalità diverse che richiedono l'impiego di definite metodologie. Mentre per alcuni tipi di intervento, ormai consolidati sul piano della finalizzazione o su quello metodologico, è possibile prevedere un prevalente impegno di competenze metodologiche o, rispettivamente, a orientamento finalizzato, nel caso di problemi emergenti appare necessaria un'integrazione tra i due tipi di competenze.

In particolare l'elemento qualificante sarà l'elaborazione e l'esecuzione di programmi di ricerca di tipo interdisciplinare che coinvolgano orizzontalmente le strutture di diversi laboratori e tengano conto delle possibilità di collaborazione con l'esterno, sia a livello nazionale sia a livello internazionale e, in particolare, comunitario. In tale programmazione si dovrà tener conto dei criteri più avanzati in tema di gestione dell'attività di ricerca, assumendo ad esempio a modello quelli adottati nella sede comunitaria i quali comportano una precisa identificazione dei compiti e delle responsabilità spettanti al comitato di

coordinamento e al direttore di progetto. Ciò renderà necessaria una serie di definizioni riguardo ai rapporti fra le decisioni assunte in materia di conduzione delle attività a livello dei laboratori e quelle caratteristiche a livello di progetto.

A tale proposito è opportuno sottolineare che tutti i programmi di ricerca saranno nel corso del 1981 valutati e discussi sia nelle varie sedi collegiali secondo quanto dispone la legge 519/1973 che a livello del Consiglio Sanitario Nazionale per una puntuale verifica dello stato di avanzamento di quelli in corso e per un esauriente esame di quelli proposti per il futuro. L'esame dettagliato riguarderà non soltanto le finalità delle ricerche proposte ma anche i relativi piani di fattibilità per anno (forze lavoro, attrezzature, ecc.) con l'obiettivo di correlare fra loro temi di ricerca condotti da differenti unità operative per un migliore coordinamento sul piano scientifico.