

Ruolo dei gangliosidi nell'iterazione tra interferone e membrana cellulare

GUIDO ANTONELLI (a), FILIPPO BELARDELLI (a), BENIAMINO SANTURBANO (a), ACHILLE ALIBERTI (b), VITO RUGGIERO (b), GIULIANO D'AGNOLO (b) e GIOVANNI BATTISTA ROSSI (c)

(a) Servizio Biologico; (b) Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia;
(c) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Sono state esaminate, nelle cellule eritroleucemiche di FRIEND (FLC), le interazioni tra l'interferone (IFN) e i gangliosidi di membrana, adottando come sistema di riferimento il modello di legame ad alta affinità tra il ganglioside G_{M1} e la tossina colerica (CT). Dalle FLC sono stati estratti e caratterizzati due gangliosidi, che migrano rispettivamente come G_{D1a} e G_{M1} . I liposomi unilamellari contenenti una miscela di gangliosidi o G_{D1a} o G_{M1} legano l'IFN 3-8 volte di più rispetto ai liposomi senza gangliosidi. Tuttavia, solo il 3-4% delle unità di IFN aggiunte risulta legato, mentre i liposomi contenenti G_{M1} legano circa il 50% di CT (3H)-acetilata. Trattando le FLC con neuraminidasi, che trasforma il G_{D1a} in G_{M1} , non si modificano gli effetti antivirali indotti dall'IFN, laddove il legame della CT alle FLC e il livello endocellulare di cAMP indotto dalla CT risultano invece marcatamente aumentati. Anche il pretrattamento delle FLC con gangliosidi commerciali oppure estratti dalle FLC medesime non influenza l'instaurarsi dello stato antivirale indotto dall'IFN. I dati sperimentali riportati indicano che nelle FLC i gangliosidi non costituiscono i recettori ad alta affinità per l'IFN, anche se essi sono capaci di legare l'IFN sino ad un certo grado.

Summary (Role of Gangliosides in the Interaction between Interferon and Cell Membrane). - The interactions between interferon (IFN) and membrane gangliosides have been studied in Friend Leukemia Cells (FLC). The high affinity binding between ganglioside G_{M1} and Cholera Toxin (CT) was adopted as a reference system. Two gangliosides, which migrate as G_{D1a} and G_{M1} respectively, have been detected and extracted from FLC. Unilamellar liposomes containing either mixed commercial gangliosides or G_{D1a} or G_{M1} bind 3-8 fold more than liposomes devoided of gangliosides. Yet, only 3-4% of the input IFN was bound, whereas G_{M1} -containing liposomes bound nearly 50% of (3H) acetyl-CT. IFN-induced antiviral effects are not significantly modified by treating FLC with neuraminidase, which transforms G_{D1a} into G_{M1} , whilst CT binding to FLC as well as CT-induced endocellular cAMP levels were strongly increased. Similarly, the IFN-induced establishment of the antiviral state was not affected by pretreating FLC with either commercial or FLC-extracted gangliosides. In conclusion, these data demonstrate that FLC gangliosides do not represent the IFN high affinity receptors, although they can bind IFN to some extent.

INTRODUZIONE.

Il meccanismo con cui l'interferone (IFN) induce nella cellula uno stato antivirale non è stato ancora completamente delucidato. Una fase cruciale, comunque, sembra essere l'interazione dell'IFN con specifici recettori di membrana [1, 2]. Anche se l'esatta natura chimico-funzionale di tali recettori non è stata ancora svelata, un complesso di evidenze sperimentali suggerisce un ruolo delle proteine di membrana e dei gangliosidi nell'instaurazione dello stato antivirale da parte dell'IFN [3-5]. È stato inoltre osservato che la tossina colerica (CT), che si lega specificamente alla porzione idrofila del ganglioside G_{M1} , è in grado di inibire la capacità dell'IFN di indurre uno stato antivirale in sistemi cellulari differenti [6, 7].

Avvalendoci di vari approcci sperimentali e adottando come sistema di riferimento il legame ad alta affinità tra il ganglioside G_{M1} e la CT, noi abbiamo studiato le interazioni tra l'IFN e i gangliosidi e il possibile ruolo svolto da questi ultimi nel processo di instaurazione dello stato antivirale nelle cellule eritroleucemiche di Friend (FLC). Le FLC sono proeritroblasti di topo cronicamente infettati dal virus di Friend (FLV), un retrovirus, che viene continuamente rilasciato nei supernatanti delle colture. L'aggiunta di basse dosi di IFN (5-100 U/ml) alle FLC causa un blocco quasi totale del rilascio di FLV. In questo sistema abbiamo già avuto modo di dimostrare [7] che la CT, come pure la sua subunità B da sola, inibiscono la riduzione, indotta dall'IFN, del rilascio di FLV e della produzione virale dopo infezione esogena con un virus citocida, quale il virus della stomatite vescicolare (VSV).

MATERIALI E METODI.

Cellule. - Le cellule eritroleucemiche di Friend (FLC), clone 745/A, venivano fatte crescere in Minimum Essential Medium (MEM) (Flow, Irvine, Scotland) con aggiunta del 10% di siero fetale di vitello (FCS) (Flow).

Interferone. - L'IFN di topo era preparato su fibroblasti di topo L₉₂₉ o C₃₄₃ (una linea cellulare trasformata dal virus sarcomatogeno di Moloney) infettati

con 10 unità emagglutinanti (per 10^6 cellule) di virus della malattia di Newcastle. Le preparazioni di IFN erano titolate e parzialmente purificate secondo le metodiche descritte da Dolei e Coll. [8]. In questo studio le quantità di IFN somministrate sono indicate in unità-topo (U). Questa unità corrisponde a 4 unità del National Institute of Health Search Standard Preparation, codice G-002-904-511. Le attività specifiche delle preparazioni di IFN variavano da 4×10^4 a 4×10^7 unità/mg di proteine.

Titolazione del VSV. - Gli stocks di VSV, come pure i supernatanti delle FLC infettate con il VSV, erano titolati mediante saggio di formazione di placche in agar su cellule L_{929} . I titoli andavano da $10^{8.5}$ a 10^9 Unità Formanti Placche (PFU)/ml.

Saggio di attività di trascrittasi inversa nei supernatanti delle FLC. - Trascorse 24 ore dalla semina delle FLC nelle diverse condizioni sperimentali, le cellule venivano contate e centrifugate a 800 g per 10 min; i supernatanti venivano chiarificati mediante successiva centrifugazione a 10.000 g per 10 min. Il saggio di attività trascrittasi inversa veniva eseguito secondo la metodica descritta da Dolei e Coll. [8].

Purificazione e marcatura della tossina colerica. - CT altamente purificata è stata generosamente fornita dal dr. Tayot (Institut Mérieux, Charbonnière les Bains, Francia) ed è stata ulteriormente purificata mediante Sephadex G75 [9]. La marcatura era effettuata con (3H)-anidride acetica [7]. L'attività specifica della CT (3H) acetilata usata negli esperimenti era di 26,14 $\mu Ci/nmole$.

Estrazione e saggio dell'AMP ciclico. - L'AMP ciclico endocellulare veniva estratto mediante cicli di estrazione con etanolo puro, e successivamente con etanolo diluito 2:1 in acqua distillata. I livelli di AMP ciclico endocellulare venivano determinati secondo la metodica di Gilman [10] usando il kit di reagenti fornito dal Radiochemical Centre, Amersham, Inghilterra.

Estrazione e caratterizzazione dei gangliosidi delle FLC. I gangliosidi delle FLC venivano estratti dai sedimenti di 10^9 FLC secondo la metodica descritta da Tettamanti e Coll. [11]. Il contenuto totale dell'acido N-acetil-neuraminico veniva invece determinato con il metodo di Svennerholm [12]. I gangliosidi delle FLC sono stati parzialmente purificati mediante cromatografia su gel di silice, avvalendosi della metodica descritta da Tettamanti [11].

Preparazione di liposomi unilamellari. - I liposomi venivano preparati al momento dell'uso con il metodo di Barenholtz e Coll. [13] e successivamente isolati dopo gel-filtrazione su una colonna Sepharose 4B ($1,5 \times 100$ cm). La quantità di ganglioside presente sulla superficie esterna dei liposomi era valutata determinando la quantità di acido N-acetil-neuraminico che veniva rilasciato dopo il trattamento dei liposomi contenenti G_{D1a} con neuraminidasi di *Clostridium perfringens*. Il 60% del contenuto totale di G_{M1} era esposto sulla superficie esterna dei liposomi [14], risultando così disponibile per eventuali legami.

Esperimenti di legame eseguiti con liposomi. - Questi esperimenti venivano effettuati mettendo a incubare l'IFN con liposomi contenenti quantità differenti di gangliosidi per 2 ore a 0 °C. L'IFN che risultava libero veniva separato dall'IFN legati ai liposomi mediante gel-filtrazione su una colonna Biogel A-1,5 m ($1,5 \times 70$ cm) equilibrata con soluzione salina di tampone fosfato (PBS). Frazioni da 1,5 ml venivano raccolte e analizzate per il contenuto in liposomi (assorbanza a 410 nm). L'attività dell'IFN nelle frazioni contenenti i liposomi veniva determinata col saggio della inibizione di placche in agar. I valori ottenuti venivano presi come indice dell'IFN legato ai liposomi.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Il sistema cellulare delle FLC costituisce un modello conveniente per lo studio delle interazioni tra i gangliosidi e l'IFN in quanto le FLC possiedono un profilo gangliosidico molto semplice. Due soli, infatti, sono i gangliosidi che in esse siamo stati in grado di identificare: un disialoganglioside che migra come G_{D1a} (95%), un monosialoganglioside che migra come G_{M1} (5%). Il disialoganglioside è sensibile alle neuraminidasi, venendo esso trasformato quasi completamente in monosialoganglioside (G_{M1}) dopo trattamento con tale enzima.

Tabella 1. - Legame dell'IFN a liposomi contenenti gangliosidi.

INTERFERONE AGGIUNTO (U)	Interferone Legato (U) a Liposomi	
	Contenenti una miscela di gangliosidi	Non contenenti nessun ganglioside
150.000	900	300
120.000	780	230
100.000	660	200
70.000	500	140
50.000	300	100
30.000	130	50
10.000	80	30

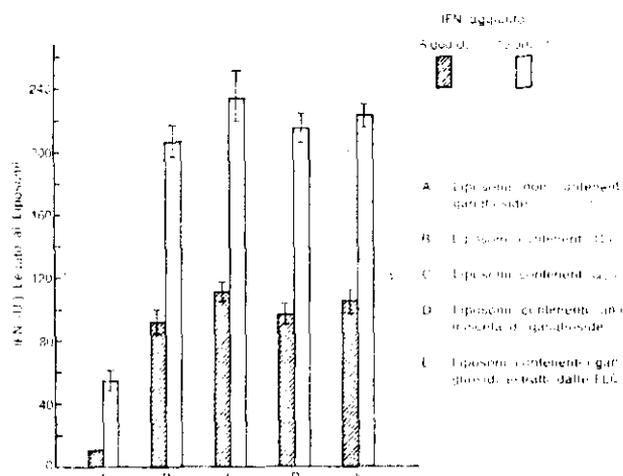


Fig. 1. - Legame dell'IFN a liposomi contenenti vari gangliosidi.

Per cercare di chiarire la natura delle interazioni tra l'IFN e i gangliosidi, abbiamo fatto uso, come sistema modello, di liposomi unilamellari. Nei liposomi la porzione idrofobica dei gangliosidi è immersa nello strato lipidico e non risulta così disponibile a ligandi solubili in acqua. I dati da noi ottenuti (Tab. 1) indicano che i liposomi contenenti gangliosidi legano l'IFN 3-8 volte di più rispetto a liposomi controllo privi di gangliosidi. Inoltre, i liposomi contenenti 15 μg di preparati gangliosidici differenti non mostrano differenze significative nell'attività di legame per l'IFN, indicando così che l'IFN non interagisce specificamente con un singolo ganglioside delle FLC (Fig. 1). Esperimenti di

controllo effettuati con IFN puro (10^9 U/mg di proteine) mostrano che i liposomi contenenti G_{M1} o G_{D1a} legano solo il 3-4% delle unità di IFN aggiunte, senza che tra di loro sussistano differenze significative. Per contro, quasi il 50% della CT (^3H)-acetilata risulta legato ai liposomi contenenti G_{M1} , confermando ulteriormente che il ganglioside G_{M1} è in effetti il recettore specifico della CT. Il trattamento delle FLC con neuraminidasi (1 ora a 37 °C, 40 mU/2 $\times 10^6$ cellule) determina un considerevole aumento sia del legame della CT (^3H)-acetilata alle FLC, sia del livello endocellulare di AMP ciclico indotto dalla CT (Fig. 2). Il medesimo trattamento non ha invece alcuna influen-

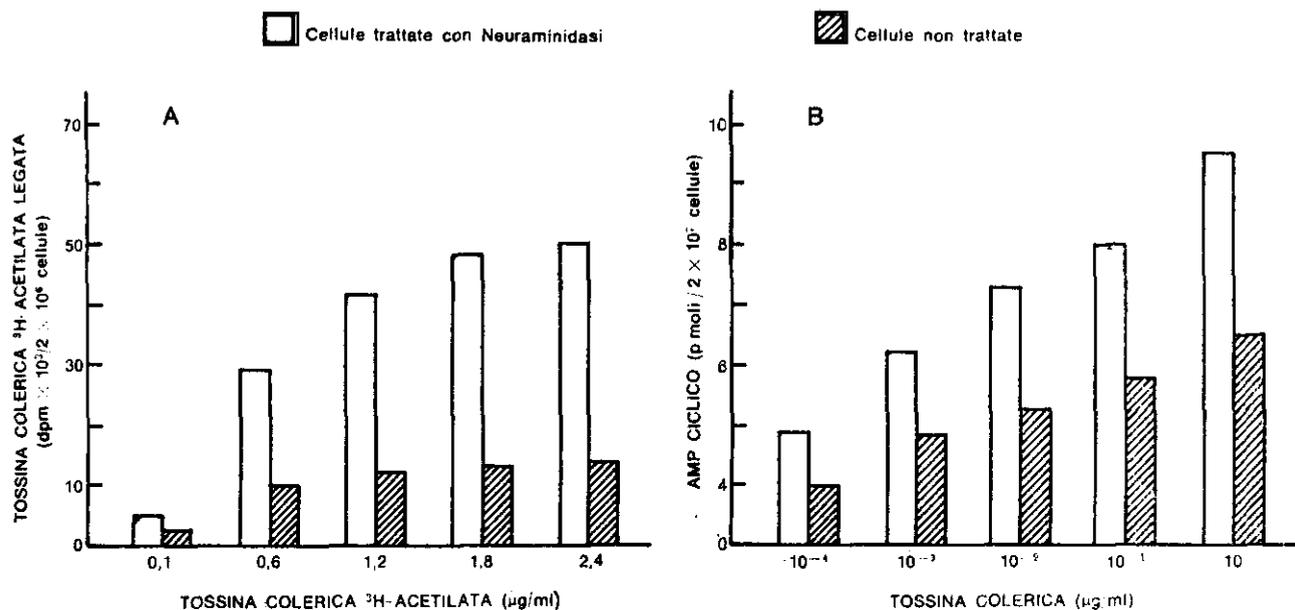


Fig. 2. - Legame della tossina colerica e livello di cAMP indotto dalla tossina colerica in FLC trattate e non trattate con neuraminidasi

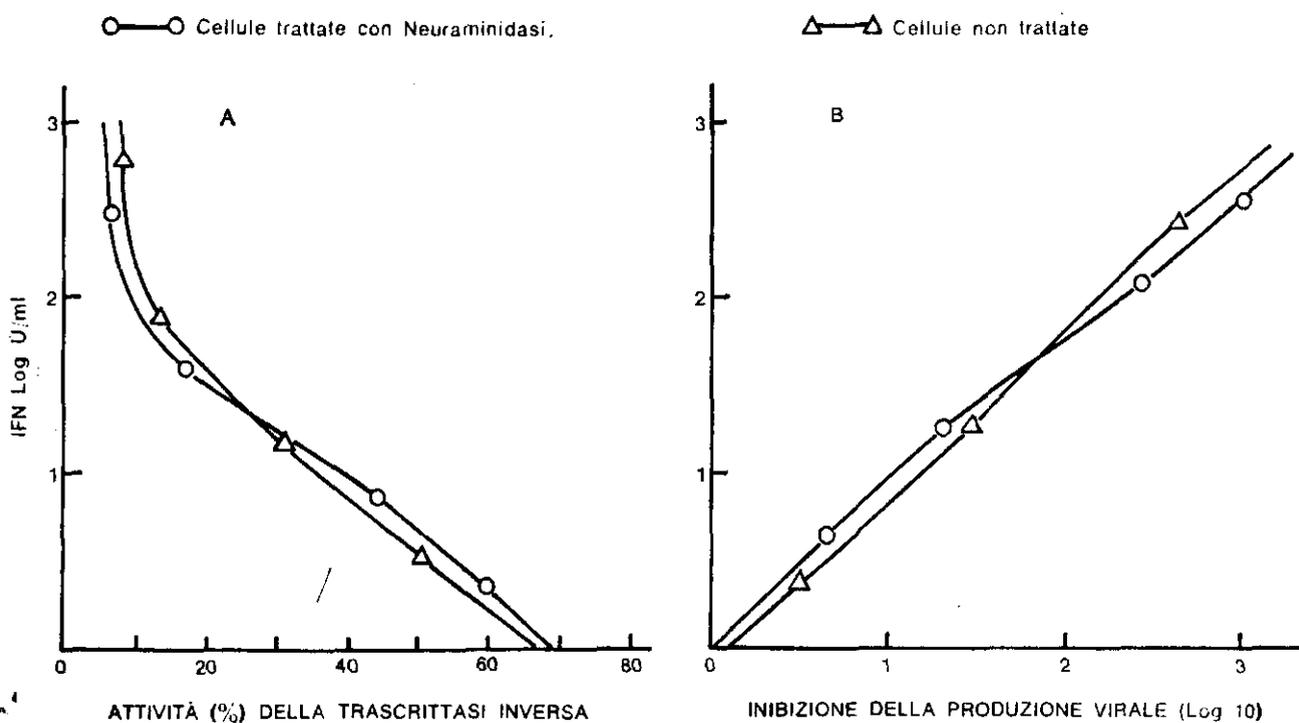


Fig. 3. - Effetti del trattamento con neuraminidasi sulle attività antivirali indotte dall'IFN

za sugli effetti antivirali indotti dall'IFN. Infatti, trattando le FLC con neuraminidasi prima dell'aggiunta di IFN nel mezzo di coltura, non si osserva alcuna riduzione del rilascio di FLV, né inibizione della produzione virale dopo infezione esogena con VSV (Fig. 3). Infine è stato analizzato il possibile ruolo di alcuni gangliosidi nel mediare le attività indotte dall'IFN. A questo fine, sono stati eseguiti degli esperimenti in cui le FLC venivano preincubate con gangliosidi differenti e successivamente trattate con IFN. I risultati indicano che l'inserzione di differenti gangliosidi nella membrana delle FLC prima dell'aggiunta di IFN non modifica, in questo sistema cellulare, le attività antivirali indotte dall'IFN. Similmente, preincubando l'IFN con differenti gangliosidi, ciascuno di essi mostra lo stesso effetto inibitorio sull'attività antivirale indotta dall'IFN. Tale effetto inibitorio sembra essere più marcato se l'IFN viene incubato con i gangliosidi a 37 °C anziché a 0 °C. Tuttavia, questa inibizione non sembra riflettere un mero processo di inattivazione dipendente dalla temperatura, poiché non si riscontra alcuna inattivazione in preparazioni di IFN tenute a 37 °C per 1 ora. Inoltre, dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio indicano che l'attività biologica dell'IFN risulta diminuita in cellule pretrattate con tripsina, suggerendo

così un possibile ruolo di recettori proteici nel legare l'IFN alla membrana plasmatica.

Avevamo dimostrato in precedenza [7] che la CT, come pure la sua subunità B purificata, è in grado di inibire nelle FLC l'azione dell'IFN. Il presente studio avvalorava ulteriormente l'ipotesi che questo effetto non sia dovuto a competizione per il medesimo recettore (G_M), ma piuttosto a variazioni secondarie nello stato conformazionale della membrana, che ostacolerebbero l'interazione dell'IFN con la superficie cellulare. I dati sperimentali qui riportati indicano che nelle FLC i gangliosidi non costituiscono i recettori ad alta affinità per l'IFN né mediano specificamente l'azione dell'IFN.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Schiffman e Koschel [15] in un diverso modello biologico. Essi hanno riscontrato solo una lieve differenza nella sensibilità all'IFN tra cellule murine L_{929} e cellule L_{929} mutanti deficienti in gangliosidi (cellule NCTC 2071). I loro esperimenti, inoltre, mostrano che il pretrattamento delle cellule NCTC 2071 con gangliosidi esogeni non determina alcun incremento nella sensibilità all'IFN da esse posseduta.

Ulteriori e più approfondite indagini si rendono dunque necessarie per chiarire l'effettivo ruolo svolto dai gangliosidi nell'azione dell'IFN.

BIBLIOGRAFIA

1. FRIEDMAN, R. M. 1967. Interferon binding: the first step in establishment of antiviral activity. *Science*. **156**: 1760-1761.
2. BERMAN, B. & VILCEK, J. 1974. Cellular binding characteristics of human interferon. *Virology*. **57**: 378-386.
3. CHANY, C. 1976. Membrane-bound interferon specific cell receptor system: role in the establishment and amplification of the antiviral state. *Biomedicine*. **24**: 148-157.
4. VENGRIS, V. E., REYNOLDS, F. H. JR., HOLLENBERG, M. D. & PITHA, P. M. 1976. Interferon action: role of membrane gangliosides. *Virology*. **72**: 486-493.
5. GROLLMAN, E. F., LEE, G., RAMOS, S., LAZO, P. S., KABACK, R., FRIEDMAN, R. M. & KOHN, L. D. 1978. Relationships of the structure and function of the interferon receptor to hormone receptors and establishment of the antiviral state. *Cancer Res.* **38**: 4172-4185.
6. FRIEDMAN, R. M. & KOHN, L. D. 1978. Cholera toxin inhibits interferon action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**: 1078-1084.
7. BELARDELLI, F., AUSIELLO, C., TOMASI, M. & ROSSI, G. B. 1980. Cholera toxin and its B subunit inhibit interferon effects on virus production and erythroid differentiation of Friend Leukemia Cells. *Virology*. **107**: 109-120.
8. DOLEI, A., COLLETTA, G., CAPOBIANCHI, M. R., ROSSI, G. B. & VECCHIO, G. 1980. Interferon effects on Friend Leukemia Cells. Expression of virus and erythroid markers in untreated and dimethyl sulfoxide-treated cells. *J. Gen. Virol.* **46**: 227-236.
9. RODA, L. G., TOMASI, M., BATTISTINI, A., LUZZI, I., MASTRANTONIO, P., ZAMPIERI, A. & D'AGNOLO, G. 1977. Heterogeneity of purified cholera toxin. *Biochem. Biophys. Acta.* **492**: 303-315.
10. GILMAN, A. G. 1970. A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **67**: 305-312.
11. TETTAMANTI, G., BONALI, F., MARCHESINI, S. & ZAMBOTTI, V. 1973. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochem. Biophys. Acta.* **296**: 160-170.
12. SVENNERHOLM, L. 1957. Quantitative estimation of sialic acids. A colorimetric resorcinol hydrochloric acid method. *Biochem. Biophys. Acta.* **24**: 604-611.
13. BARENHOLZ, Y., GIBBES, D., LITMAN, B. J., GOLL, J., THOMPSON, T. E. & CARLSON, F. D. 1977. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochem.* **16**: 2806-2810.
14. TOMASI, M., RODA, L. E., AUSIELLO, C., D'AGNOLO, G., VENERANDO, B., GHIDONI, R., SONNINO, S. & TETTAMANTI, G. 1980. Interaction of G_M ganglioside with bovine serum albumin formation and isolation of multiple complexes. *Eur. J. Biochem.* **111**: 315-324.
15. SCHIFFMAN, D. & KOSCHEL, K. 1981. IFN induces an antiviral state in ganglioside deficient transformed mouse fibroblasts. *Med. Microbiol. Immunol.* **169**: 281-289.

Rilievi virologici della stagione influenzale 1980-81

ISABELLA DONATELLI, GUIDO ARANGIO-RUIZ e GABRIELLA MANCINI

Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Vengono riportati i dati delle indagini virologiche relative ai virus influenzali circolanti in Italia nell'inverno 1980-81. Dai risultati ottenuti è stato possibile tracciare il quadro della passata stagione, caratterizzato dalla eterogenea circolazione delle varianti antigeniche dei due sottotipi A/H3N2 e A/H1N1, contemporaneamente a quella delle varianti del virus influenzale di tipo B. Il sottotipo H3N2 ha avuto la maggiore diffusione, e tra le sue varianti l'A/Bangkok/1/79 è stato isolato nella maggior parte dei casi.

Summary (Isolation of Influenza Viruses during 1980-1981). - The data about isolation in Italy of influenza Virus, during 1980-81 winter, are reported. The main feature of this season appears to be the simultaneous circulation of the two subtypes A/H3N2, A/H1N1 and of the different strains of the type B. The A/Bangkok/1/79 strain (H3N2) was the most frequently isolated.

INTRODUZIONE.

Tra gli agenti virali infettanti l'uomo, i virus influenzali, particolarmente quelli di tipo A, sono gli unici che presentano modificazioni di varia natura ed entità nella loro struttura antigenica; questi cambiamenti possono tradursi in variazioni di modeste proporzioni, conseguenti ad un processo lento e continuo di adattamento immunologico ovvero in variazioni improvvise e profonde, tali da creare importanti problemi di ordine epidemiologico e pratico legato all'immunoproflassi dell'influenza. L'epidemiologia del virus influenzale si è andata inoltre complicando in questi ultimi anni per l'insorgenza di eventi che hanno portato alla revisione di alcuni concetti classici, quali ad esempio quello della circolazione di un unico sottotipo, poiché si era osservato che l'emergenza di uno stipite nuovo portava sempre alla pronta scomparsa del vecchio. Dal 1977, infatti, allorché si ebbe l'inatteso ritorno, dopo un'assenza di circa venti anni, del sottotipo A/H1N1, assistiamo alla simultanea circolazione dei sottotipi A, l'H3N2, stipite circolante dal 1968, e l'H1N1, il nuovo. D'altra parte, il potenziamento dei programmi di sorveglianza e l'impiego di tecniche sempre più sofisticate hanno reso possibile una maggiore e più approfondita caratterizzazione degli stipiti isolati. Si spiega così la contemporanea circolazione, osservata in questi ultimi anni, di una molteplicità di ceppi anti-

genicamente distinguibili, nell'ambito di uno stesso sottotipo.

Ogni anno si rende sempre più indispensabile, principalmente ai fini di una corretta composizione del vaccino antinfluenzale, l'isolamento e la caratterizzazione antigenica degli stipiti circolanti in periodo epidemico.

MATERIALI E METODI.

Popolazione esaminata. - I prelievi sono stati effettuati in individui, di ambo i sessi e di tutte le età, giunti all'osservazione nel periodo compreso tra dicembre 1980 e aprile 1981. I casi esaminati, ad eccezione di un piccolo gruppo proveniente da una comunità chiusa (convento di clausura), appartenevano a popolazione aperta.

Campioni esaminati. - Il materiale in esame consisteva in tamponi faringei o gargarizzati, prelevati nella fase acuta della malattia, da pazienti con sindrome clinica di influenza.

Isolamento. - È stato effettuato in uova embrionate di pollo, in cavità amniotica e allantoidea, secondo la tecnica indicata dalla Organizzazione Mondiale della Sanità [1].

Tipizzazione. - I virus isolati venivano identificati mediante la prova di Inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) [1], impiegando antisieri specifici di referenza provenienti dal WHO Collaborating Center, Atlanta-U.S.A.

RISULTATI.

I risultati delle nostre indagini hanno messo in evidenza, oltre al perdurare della simultanea circolazione dei sottotipi A/H3N2 e A/H1N1, anche la presenza di un inconsueto numero di ceppi influenzali differenti di tipo A e di tipo B, provenienti anche da uno stesso focolaio. Tra i ceppi isolati, 56 provenivano da casi sporadici, 100 da piccoli focolai epidemici verificatisi in varie regioni italiane e 18 da una comunità chiusa.

Nella Tab. 1 vengono riportati i dati relativi alla tipizzazione dei ceppi isolati nel periodo di osservazione, su tutto il territorio nazionale. È possibile rilevare la netta prevalenza del tipo A sul tipo B: su un

totale di 174 isolamenti, 142 (81,60 %) si riferiscono infatti al primo, mentre solo 32 (18,39 %) al secondo. Nell'ambito del tipo A, inoltre, si è riscontrata una maggiore circolazione del sottotipo H3N2 (54,59 %): in particolare, il ceppo A/Bangkok/1/79 è stato evidenziato in un'altissima percentuale di casi (78 %), mentre solo una minima percentuale di isolati (9,47 %) erano riconducibili al ceppo A/Texas/1/77. Questi valori ripropongono, ma in maniera ancora più accentuata, la situazione verificatasi nella stagione invernale 1979-80, in cui pure si era avuta la prevalenza del ceppo A/Bangkok sul ceppo A/Texas (69,14 % su 24,46 %).

Tabella 1. - Tipizzazione dei virus influenzali isolati nell'inverno 1980-81 in Italia.

Tipo	Sottotipo	Ceppo	N. isolamenti	
A 142 (81,60%)	H ₃ N ₂ 95 (54,59%)	A/Bangkok/1/79	72 (78%)	
		A/Texas/1/77	9 (9,47%)	
		Intermedi $\left\{ \begin{array}{l} \text{A/Bangkok/} \\ \text{1/79} \dots \end{array} \right.$ $\left\{ \begin{array}{l} \text{A/Texas/} \\ \text{1/77} \dots \end{array} \right.$	14 (14,73%)	
	H ₁ N ₁ 47 (27,01%)	A/Brazil/11/78	22 (46,80%)	
		A/URSS/90/77	23 (48,93%)	
		Intermedi $\left\{ \begin{array}{l} \text{A/Brazil/} \\ \text{11/78} \dots \end{array} \right.$ $\left\{ \begin{array}{l} \text{A/URSS/} \\ \text{90/77} \dots \end{array} \right.$	2 (4,25%)	
	B 32 (18,39%)		B/Singapore/222/79	21 (65,60%)
			B/Hannover/13/78	6 (18,70%)
			B/Hong Kong/5/72	5 (15,60%)

Sono stati poi isolati 14 ceppi classificati come « intermedi », cioè ceppi che all'IEA reagivano ugualmente bene con i due antisieri specifici. All'interno del sottotipo A/H1N1 sono stati isolati, più o meno nelle stesse proporzioni, i due ceppi circolanti in questi ultimi anni: in 24 casi (51,06 %) si è identificato l'A/Brazil/11/78 e in 23 (48,93 %) l'A/URSS/90/77. Per quanto riguarda invece il tipo B, gli isolamenti hanno dimostrato, all'identificazione antigenica, una marcata eterogeneità, caratterizzata dalla circolazione di tre diversi ceppi: B/Singapore/222/79, isolato in 21 casi (65,60 %), B/Hannover/13/78 in 6 casi (18,70 %) e B/Hong Kong/5/72 in 5 casi (15,60 %).

L'incidenza mensile degli isolamenti e dei ceppi circolanti è mostrata nella Fig. 1: il massimo numero si è avuto nel mese di gennaio e dagli istogrammi risulta la maggior diffusione del sottotipo H3N2 rispetto all'H1N1 e al tipo B che è stato più frequentemente isolato nei mesi di febbraio e marzo.

Sono stati inoltre isolati 6 ceppi, che alla IEA, eseguita sia con sieri di furetto che di pollo, hanno mo-

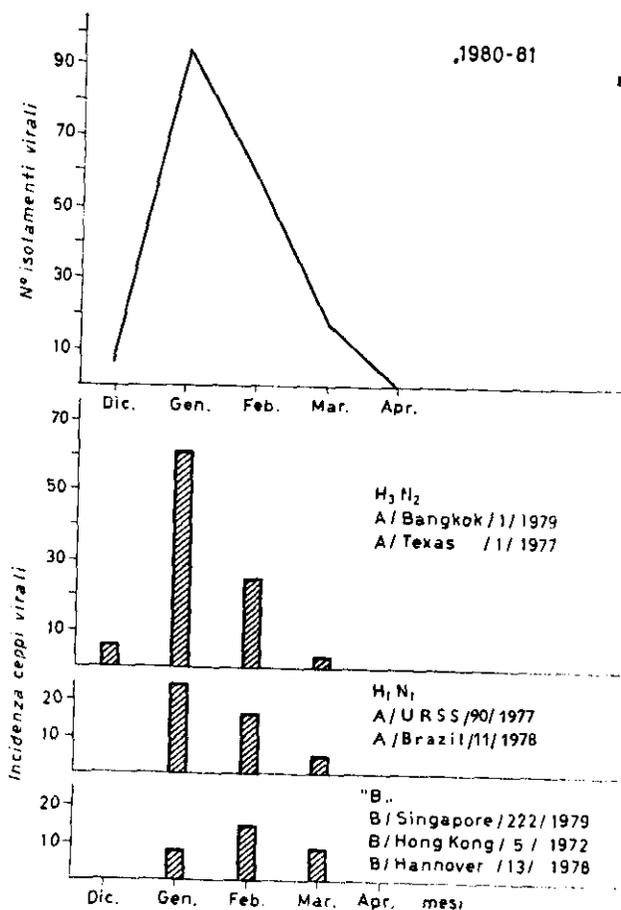


Fig. 1. - Incidenza mensile degli isolamenti e dei ceppi circolanti nella stagione 1980-81 in Italia

strato reazione positiva per ambedue i sottotipi, anche se a titolo marcatamente differente. Come mostrato nella Tab. 2, i 3 ceppi isolati a Roma e quello isolato a Trieste hanno un titolo IEA di 1 : 2560 per l'A/Bangkok/1/79 e di 1 : 40 per l'A/URSS/90/77; il ceppo isolato a Firenze ha un titolo di 1 : 640 per l'A/Bangkok e di 1 : 40 per l'A/URSS, mentre il ceppo isolato a Milano ha un titolo di 1 : 40 per l'A/Bangkok e di 1 : 1280 per l'A/URSS.

Tabella 2. - Tipizzazione di ceppi con antisieri di furetto (IEA).

CEPPI ISOLATI	ANTISIERI DI FURETTO	
	A/Bangkok/1/79	A/URSS/90/77
A/Roma/27/81	1 : 2560	1 : 40
A/Roma/28/81	1 : 2560	1 : 40
A/Roma/29/81	1 : 2560	1 : 40
A/Trieste/2/81	1 : 2560	1 : 40
A/Firenze/2/81	1 : 640	1 : 40
A/Milano/90/81	1 : 40	1 : 1280

CONCLUSIONI.

Malgrado la multiforme circolazione di ceppi virali, registrata dalle nostre indagini, le manifestazioni influenzali della passata stagione non hanno presentato carattere di particolare gravità, come risulta anche dai dati riportati nella letteratura internazionale [2-4], che mettono anche in evidenza la relativa modesta diffusione della malattia. È da tenere presente che il numero degli isolamenti virali non rispecchia la reale incidenza della malattia, ma dà un'idea della diffusione

dei vari ceppi. Di particolare rilievo è stato l'isolamento di ceppi virali antigenicamente correlati con due diversi sottotipi da una singola persona. Il significato di questi risultati, ancora in studio, potrebbe essere spiegato, data la simultanea circolazione dei due sottotipi nella popolazione, con una doppia infezione e suggerire, come già riportato nella letteratura, un riassortimento genetico nell'uomo [5].

Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto Finalizzato « Virus » del C.N.R., Contratto n. 8100250.84.

BIBLIOGRAFIA

1. Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis. 1975. Department of Health, Education and Welfare, U.S.A.
2. Influenza Surveillance November 1980-June 1981. *Br. Med. J.* **283**: 318.
3. Influenza 1980-81. *Br. Med. J.* **6239**: 527-528.
4. KENDAL, A. P., LEE, D. T., PARISH, H. S., RAINES, D., NOBLE, G. R. & DOWDLE, W. R. 1979. Laboratory-based surveillance of Influenza virus in the United States during the winter of 1977-78. II) *Am. J. Epidemiol.* **110**(4): 462-468.
5. WEBSTER, R. G. & SCHILD, G. C. 1978. Summary of the International Workshop on the Ecology of Influenza viruses. *J. Infect. Dis.* **138**(1): 110-113.

Studio epidemiologico delle infezioni da rotavirus nell'immaturato

GIANFRANCO DONELLI (a), GIOVANNI ROCCHI (b), DONATO MENICHELLA (c),
ANGELO VARVERI (c), FRANCESCO TANGUCCI (a), SILVIA RESTA (b),
MARIA DANIELA CAIONE (c), ARIEL ZARD (b) e ANTONELLA TINARI (a)

(a) Istituto Superiore di Sanità, Roma; (b) Clinica Medica III, Università degli Studi, Roma;
(c) Ospedale Pediatrico « Bambino Gesù », Roma

Riassunto. - Vengono riportati i risultati di uno studio longitudinale della durata di un anno, condotto su 287 piccoli ricoverati di un reparto ospedaliero per immaturi, allo scopo di valutare l'incidenza delle infezioni enteriche da virus in questa particolare categoria di pazienti.

L'osservazione elettronmicroscopica dei campioni fecali relativi ai soggetti studiati, congiuntamente all'analisi dei dati clinici, ha indicato: a) una escrezione di rotavirus nel 39% e di altri virus nell'8% dei casi; b) una più elevata frequenza di infezioni nei mesi di ottobre 1980, gennaio-marzo e maggio 1981; c) una incidenza di gastroenteriti acute, associate cronologicamente alla escrezione virale, pari al 58%.

Summary (Epidemiological Survey of Rotavirus infections among Premature Infants). - A one-year longitudinal study on viral infections among all premature and dysmature babies admitted to the special care ward of the « Bambino Gesù » paediatric hospital in Rome has been performed from October 1980 to September 1981. The electron microscopic observation of faecal samples collected from the 287 hospitalized cases, together with the analysis of clinical data, provided evidence of: a) rotavirus and other virus excretion in 39% and 8% of cases, respectively; b) peaks of high frequency of infections in October 1980, January-March and May 1981; c) occurrence of associated gastroenteritis in about 58% of rotavirus excretors.

INTRODUZIONE.

Precedenti osservazioni relative a numerosi casi di gastroenterite, occorsi nel febbraio-marzo 1980 in occasione di una epidemia da rotavirus da noi evidenziata in un reparto immaturi [1], hanno suggerito l'avvio di uno specifico programma di sorveglianza, della durata di un anno, volto ad ottenere una più significativa valutazione del rilievo che tali infezioni assumono nelle enteriti dell'immaturato. È noto infatti che i rotavirus sono in grado di causare infezioni enteriche in soggetti appartenenti ad ogni classe di età, ma che la gastroenterite si manifesta con maggior frequenza e gravità nella prima e seconda infanzia, mentre l'infezione in età neonatale decorre solitamente in forma asintomatica [2, 3]. Nell'immaturato, invece, l'infezione può comportare gradi diversi di espressione enterica, con manifestazioni cliniche talora lievi [4], talora di discreto impegno [1] o anche di notevole gravità [5].

Scopo di questa nota è quello di riportare i risultati ottenuti dall'indagine epidemiologica condotta, nell'apposito reparto dell'Ospedale « Bambino Gesù » di Roma, tra l'ottobre 1980 ed il settembre 1981, periodo in cui sono stati raccolti ed esaminati al microscopio elettronico oltre 2.000 campioni fecali relativi ai 287 immaturi ricoverati.

MATERIALI E METODI.

L'indagine ha preso in considerazione tutti i neonati prematuri o dismaturi, ricoverati dall'ottobre 1980 al settembre 1981 nel reparto specialistico dell'Ospedale « Bambino Gesù » di Roma. I neonati entrano di norma nel reparto nel corso della prima giornata di vita; la durata media della degenza è dell'ordine dei 40 giorni, con variazioni comprese tra due settimane e tre mesi. Campioni di feci per la ricerca del virus al microscopio elettronico sono stati prelevati all'arrivo in reparto di ciascun neonato, e successivamente due volte alla settimana, per tutta la durata del ricovero. I campioni sono stati risospesi al 20% in soluzione salina tamponata, e quindi centrifugati a 4.500 g per 1 h; il soprannatante è stato poi centrifugato a 180.000 g per 90' e il sedimento risultante è stato risospeso in 0,05 ml di acqua distillata. Le sospensioni poste su retino e contrastate con fosfotungstato di sodio 1% a pH 7,4 sono state esaminate al microscopio elettronico (Siemens mod. 102) ad un ingrandimento di 40.000×.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Infezioni da rotavirus sono state documentate nel 40% circa dei casi studiati con picchi di maggior frequenza nell'ottobre 1980, nel trimestre gennaio-marzo e nel maggio 1981. Infezioni da altri virus, (astrovirus, adenovirus e piccoli virus), sebbene in assai più ridotta percentuale, sono state altresì evidenziate lungo l'intero periodo studiato, ma in nessun campione fecale si è riscontrata presenza contemporanea di rotavirus e di altri virus. In Tab. 1 è mostrato l'andamento temporale delle infezioni da rotavirus individuate nei degenti tenuti in osservazione. Le Fig. 1, 2, 3, 4, mostrano

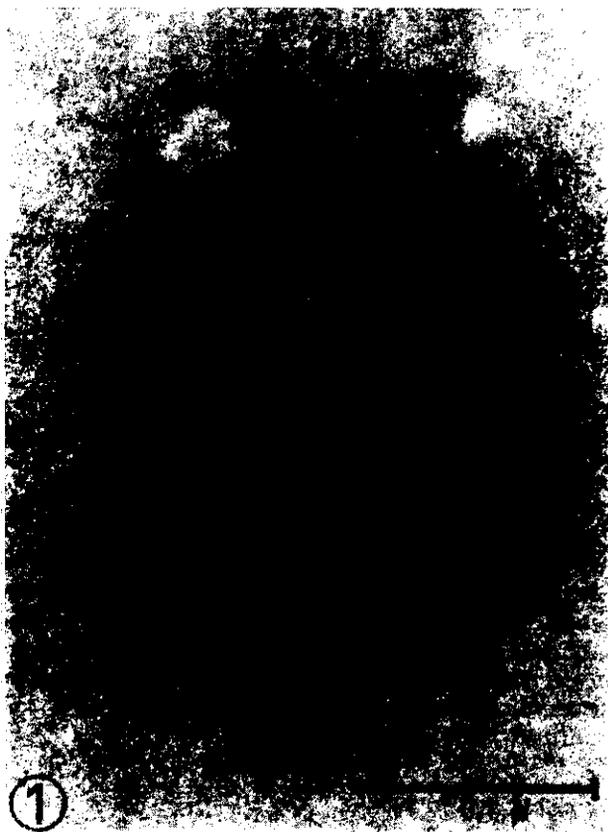


FIG. 1



FIG. 2

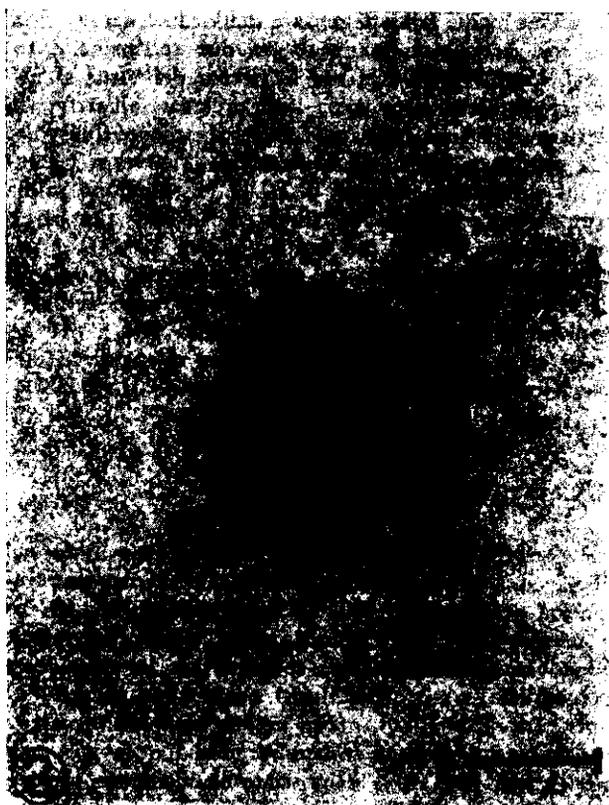


FIG. 3



FIG. 4

Tabella 1. - Distribuzione mensile delle infezioni da rotavirus in un reparto per immaturi.



immagini elettroniche ottenute da campioni relativi a casi che hanno presentato eliminazione fecale, rispettivamente di rotavirus, astrovirus, adenovirus e piccoli virus non identificabili di 22-24 nm di diametro. Lo studio della distribuzione mensile ha permesso di individuare alcuni periodi di maggior frequenza della infezione in corrispondenza del mese di ottobre 1980 (59% di positivi su 34 ricoverati), del trimestre gennaio-marzo 1981 (35% di positivi su 122 ricoverati) ed ancora del maggio 1981 (29% di positivi su 45 ricoverati).

L'esame preliminare dei dati clinici, relativi ai soggetti risultati positivi per rotavirus (Tab. 2), ha mostrato una frequenza di gastroenteriti acute, associate

cronologicamente alla escrezione virale, pari al 58%. La manifestazione clinica dell'infezione, caratterizzata da diarrea persistente per oltre due giorni, associata spesso a vomito e occasionalmente a febbre, ha determinato in tutti i casi disidratazione e temporaneo arresto nell'atteso aumento del peso corporeo.

Tabella 2.

Anno	MESI STUDIATI	Casi Rotavirus (+) Casi studiati	%	Gastroenteriti Rotavirus (+) Casi Rotavirus (+)	%
1980	Ottobre ...	20/34	59	5/20	25
	Novembre .	6/27	22	4/6	66
	Dicembre ..	6/25	24	4/6	66
1981	Gennaio ...	18/43	42	7/18	39
	Febbraio ...	13/39	33	5/13	38
	Marzo	12/40	30	8/12	66
	Aprile	1/36	3	0/1	—
	Maggio	13/45	29	4/13	31
	Giugno	6/38	16	3/6	50
	Luglio	8/39	21	5/8	62
	Agosto	10/36	28	9/10	90
	Settembre ..	7/43	16	7/7	100
Ottobre/Settembre		113/287	39	66/113	58

I dati raccolti indicano nel loro complesso come, alla stagionalità invernale caratteristica dell'epidemiologia delle infezioni da rotavirus nei paesi a clima temperato, si possano aggiungere, in condizioni particolari quali l'ospedalizzazione, ricorrenze epidemiche subentranti, che richiedono il mantenimento di attività di sorveglianza necessarie per determinare eventuali interventi mirati, sia di ordine preventivo che terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

1. ROCCHI, G., VELLA, S., RESTA, S., COCHI, S., DONELLI, G., TANGUCCI, F., MENICHELLA, D., VARVERI, A. & INGLESE, R. 1981. Outbreak of rotavirus gastroenteritis among premature infants. *Br. Med. J.* **283**: 886.
2. BLACKLAW, N. R. & CUKOR, G. 1981. Viral gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* **304**: 397-406.
3. MURPHY, A. M., ALBREY, M. B. & CREWE, E. B. 1977. Rotavirus infections of neonates. *Lancet.* **2**: 1149.
4. VAN RENYERGHEN, L., BORRE, P. & TILLEMANN, J. 1980. Rotavirus and other viruses in the stool of premature babies. *J. Med. Virol.* **5**: 137-142.
5. THOMSON, A. H., DEARLOVE, J., LEWIS, I., LATHAM, P., BIRKIN, N. & KEOGH, A. 1981. Outbreak of rotavirus gastroenteritis among premature infants. *Br. Med. J.* **283**: 1405.

Programma ed esecuzione di una campagna di vaccinazione antimorbillosa controllata in sede locale

REGINA SANTORO (a), MAURO POLO (b), EGIDIO RIGOLI (c), UBALDO SCARDELLATO (c), ISABELLA ANNESI (d), MICHELE E. GRANDOLFO (d) e FRANCESCO NOVELLO (a)

(a) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma;
(b) USL/10, Settore Materno-Infantile, Treviso; (c) Presidio Ospedaliero Multizonale USL/10, Treviso;
(d) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - La vaccinazione antimorbillosa in Italia non è una profilassi abituale. È stata condotta una campagna di vaccinazione antimorbillosa in un comune vicino Treviso di 13.353 abitanti, con una popolazione bersaglio di 1.637 bambini di età compresa tra 15 mesi e 7 anni. Un comune vicino è stato considerato come controllo. Lo studio è stato condotto per verificare i problemi operativi relativi all'introduzione della profilassi di massa. Una indagine campionaria sulle conoscenze, le attitudini e la pratica (CAP) riguardanti le vaccinazioni ha mostrato che solo il 36% degli intervistati sapeva dei rischi del morbillo nell'infanzia. Prima della campagna di vaccinazione il sistema di sorveglianza rilevò 19 casi di morbillo, per ciascuno dei quali è stata accertata la catena di trasmissione. I suscettibili sono stati identificati mediante siero-indagine e l'82% di questi ha accettato la vaccinazione. La specificità del ricordo dei genitori rispetto al test sierologico è risultata del 92%. La sieroconversione è stata osservata nel 96% dei vaccinati. La febbre ($> 38,5\text{ C}$) e l'esantema sono stati osservati rispettivamente nel 19% e nel 5% dei vaccinati; una indagine campionaria caso-controllo ha rivelato sintomi simili nel 4% dei controlli non vaccinati. Un'indagine campionaria sui non vaccinati ha messo in evidenza che solo il 36% di essi era fortemente contrario alla vaccinazione. Una seconda indagine CAP è stata condotta in entrambi i Comuni. Vengono riportati i cambiamenti dai risultati iniziali.

Summary (Pilot Measles Vaccination Campaign in a Delimited and Controlled Area). - Measles vaccination is not practiced in Italy. We conducted a measles vaccination campaign in a town of 13,353 inhabitants with a target population of 1,637 children aged 15 mos-7 yrs. A North-east Italy nearby town in which no special campaign was launched served as control. The study sought to define the operational problems to be anticipated in introducing mass measles prophylaxis. A sampling survey of knowledge, attitudes and practices (KAP) regarding vaccinations showed that only 36% of those interviewed recognized the risks of childhood measles and only 25% knew the availability of measles vaccine. Before the vaccination campaign, 19 measles cases were detected by our surveillance system; the chain of transmissions was delineated for each. Susceptibles were identified by serosurvey and 82% of these accepted vaccinations. The specificity of the parents recollection compared with the sero-

logical test resulted 92%. The proportion seroconverting was 96%. Fever ($> 38.5\text{ C}$) and rash were observed in 19% and 5%, respectively; a sampling case-control study revealed similar symptoms in 4% of unvaccinated controls. A sampling survey of those remaining unvaccinated revealed only 36% firmly opposed to vaccination. A follow-up KAP survey was performed in both towns. The changes from the initial findings are reported.

INTRODUZIONE.

Da più di 15 anni si vaccina nel mondo contro il morbillo, con differenti strategie e differenti risultati. Si è avuta una drastica riduzione, fino alla quasi scomparsa, dei casi di morbillo e delle complicanze associate, in quei Paesi in cui la Sanità pubblica ha assunto un ruolo attivo nella vaccinazione di tutti i suscettibili [1-12]. I vaccini usati nel mondo si sono dimostrati altamente efficaci e sostanzialmente innocui, l'immunità conferita sembra essere permanente [13]. Per introdurre efficacemente in Italia la vaccinazione di massa contro il morbillo, è necessario valutare e risolvere i problemi operativi connessi con l'esecuzione della profilassi: chi, quando, dove, come vaccinare. In studi precedenti è stato delineato il quadro epidemiologico della malattia in Italia [14-16]; in questo studio si valutano le possibilità operative delle strutture sanitarie coinvolte nell'esecuzione della campagna di vaccinazione antimorbillosa di massa, misurando:

- 1) l'efficacia della vaccinazione e l'entità degli effetti collaterali;
- 2) gli effetti della campagna di educazione sanitaria svolta prima e durante la vaccinazione.

Popolazione in studio. - La campagna di vaccinazione è stata effettuata nel comune di Paese, 6 Km ad Ovest di Treviso, con 13.353 abitanti e 1.637 bambini tra 15 mesi e 7 anni (marzo 1980, popolazione bersaglio). Il comune di Villorba, 5 Km a Nord-Est di Treviso, con 14.343 abitanti e 1.447 bambini tra 15 mesi e 7 anni, è stato assunto come controllo. Nel comune di Paese, dei 1.637 bambini uno presentava un deficit IgA e 12 risultavano già vaccinati.

Tabella 1. - Risultati della prima analisi sierologica.

	A N N I								TOTALE
	1	2	3	4	5	6	7	8	
N. bambini	149	176	222	228	231	259	261	98	1.624
Prelievi	126	142	190	198	210	244	251	94	1.455
% prelievi	84,5	80,7	85,6	86,8	90,9	94,2	96,2	95,9	89,6
Positivi	—	17	46	58	115	190	214	82	722
% positivi	0	12,0	24,2	29,3	54,8	77,9	85,3	87,2	49,6
Tit. geom. M.	—	14,6	27,6	21,3	17,1	24,6	33,4	31,5	—

METODI.

Educazione sanitaria. - L'informazione sulla malattia e sulla vaccinazione è stata fornita alla popolazione mediante lettere, manifesti murali, riunioni pubbliche con gli operatori sanitari del luogo e con opuscoli illustrativi.

Valutazione dell'impatto della campagna di educazione sanitaria. - La misura delle conoscenze e delle loro variazioni è stata effettuata mediante due indagini campionarie del tipo «Conoscenza, Attitudine, Pratica» (CAP), all'inizio ed alla fine della campagna di vaccinazione nei comuni di Paese e di Villorba. Il questionario, contenente domande sulle vaccinazioni più importanti e sul morbillo, è stato somministrato al 10% delle famiglie con figli da 0 a 14 anni, così da poter apprezzare differenze del 10% attorno a percentuali del 50% con un livello di significatività del 5%.

Indagine sieroepidemiologica. - Per ogni bambino della popolazione bersaglio è stata compilata una scheda individuale con i dati anagrafici più importanti e quelli anamnestici riguardanti il morbillo; sulla stessa scheda venivano registrati i dati di un eventuale morbillo dopo l'inizio dello studio, quelli della eventuale vaccinazione e i risultati sierologici prima e dopo la vaccinazione. Il prelievo è stato effettuato in giorni stabiliti negli ambulatori della zona. L'analisi sierologica è stata effettuata con il test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) [17]. Per i titoli più bassi, al secondo prelievo il dosaggio degli anticorpi è stato ripetuto in doppio con il siero del 1° prelievo.

Vaccinazione. - Le sedute vaccinali sono state organizzate per frazioni e nelle sedi ambulatoriali. L'Ufficiale Sanitario è stato l'unico vaccinatore (svolge abitualmente tale funzione per le vaccinazioni obbligatorie). La vaccinazione, per via sottocutanea in regione glutea o deltoidea, è stata effettuata con vaccino «Morbilvax» della Sclavo ed è stata offerta a tutti i bambini sieronegativi al test HI e a quei bambini per i quali non era stato effettuato il prelievo.

Sistema di sorveglianza. - Le basi del sistema di sorveglianza erano costituite dal Consultorio pediatrico (rappresentante il Centro), dai pediatri e medici di base della zona e dalle segreterie scolastiche. Il Centro contattava i medici settimanalmente e le segreterie trisettimanalmente (per le assenze superiori ai 6 giorni) e disponeva le eventuali indagini domiciliari.

Controllo degli effetti collaterali. - Tutti i bambini vaccinati sono stati invitati alla visita medica dopo 15 giorni dalla vaccinazione. A una parte dei bambini vaccinati (il 20%) è stato accoppiato per età e per zona di residenza un uguale campione di bambini sieropositivi alla 1ª indagine, così da rendere possibile uno studio caso-controllo sugli effetti collaterali. La selezione è stata effettuata per entrambi i campioni con procedura random sistematica; la dimensione del campione (122 vaccinati e 122 controlli) permette di apprezzare in modo significativo (5%) la differenza tra un minimo del 20% di effetti collaterali nei vaccinati e un massimo del 10% di sintomi simili nei controlli. Per i controlli è stata effettuata una visita domiciliare.

Analisi del rifiuto della vaccinazione. - È stata effettuata una indagine campionaria (con selezione random sistematica) sul 20% dei 149 supposti suscettibili non vaccinati, mediante intervista domiciliare.

RISULTATI.

Indagine sieroepidemiologica. - Dei 1.624 bambini per i quali era richiesta l'indagine, 722 sono risultati positivi al test HI, 733 negativi e per 169 il prelievo non è stato eseguito. L'analisi sierologica ha quindi riguardato l'89,6% del totale e il 50,4% è risultato suscettibile. La Tab. 1 mostra i risultati sierologici disaggregati per classe di età; in particolare, è possibile rilevare che il 50% di naturalmente immuni si ha attorno al 5° anno. La Tab. 2 mostra la distribuzione di bambini per i quali è stata effettuata l'analisi sierologica secondo il risultato del test e secondo il ricordo dei genitori. La specificità del ricordo rispetto al test HI (Ricordo negativo con test negativo/Totale test negativo) risulta

Tabella 2. - Relazione tra il risultato dell'analisi sierologica e il ricordo dei genitori.

R I C O R D O	Risultato del test sierologico	
	Positivo	Negativo
Di avvenuta malattia	587	58
Di non avvenuta malattia	92	626
TOTALE ...	679	684

del 91,5%, il che significa che su 100 bambini che non hanno anticorpi HI, i genitori di 92 ricordano che i loro figli non hanno avuto il morbillo.

Sistema di sorveglianza. - Sono stati rilevati 19 casi di morbillo, per ciascuno dei quali è stata accertata la catena di trasmissione. L'epidemia ha avuto inizio nel mese di marzo e la vaccinazione, effettuata tra l'8 e il 12 aprile, ha stroncato lo sviluppo ulteriore dell'epidemia, bloccando di fatto la propagazione alla terza generazione.

Vaccinazione. - Sono stati vaccinati 687 bambini su un totale di 836 da vaccinare (bambini sieronegativi e bambini senza prelievo, esclusi quelli con ricordo positivo di avvenuta malattia). Pertanto la percentuale dei vaccinati è stata dell'82,2%.

Sieroconversione. - Il secondo prelievo è stato effettuato per l'83,6% dei vaccinati e la Tab. 3 mostra i risultati della sieroconversione per classe di età. La sieroconversione è stata osservata nel 96% dei vaccinati e va tenuto conto che i 6 bambini di 6 anni, per i quali non è stato osservato movimento anticorpale, sono stati vaccinati nella stessa seduta vaccinale; potrebbe trattarsi pertanto di un *cluster* con difettosa procedura di vaccinazione.

Effetti collaterali. - Dei bambini vaccinati, 593 sono stati visitati dal pediatra del Consultorio al 15° giorno dalla vaccinazione. Gli effetti collaterali sono stati osservati in media dopo 10 giorni dalla vaccinazione e la loro durata media è stata di 2-3 giorni. L'esantema è comparso nel 5,2% dei controllati e la febbre $> 38,5$ C ($> 39,5$ C) nel 18,9% (3,2%) dei controllati. L'indagine caso-controllo sugli effetti collaterali ha mostrato che nel campione dei vaccinati l'esantema è comparso nel 5,7%, la febbre $> 38,5$ C ($> 39,5$ C) nel 21,3% (4,9%); nei controlli la febbre $> 38,5$ C è comparsa nel 4,1% del campione.

Analisi del rifiuto della vaccinazione. - L'indagine campionaria ha permesso di verificare che il 35,7% degli intervistati ha rifiutato la vaccinazione per una propria posizione contraria o per opposizione del medico curante, il 21,4% perché non la riteneva necessaria, in quanto non obbligatoria e non estesa a tutto il territorio nazionale, il 42,9% per motivi contingenti (mancanza di tempo, condizioni di salute del bambino non buone).

Misura degli effetti della campagna di educazione sanitaria. - Nel comune di Paese la vaccinazione antimorbillosa era conosciuta dal 7% degli intervistati (a Villorba dal 9%) (domanda: quali vaccinazioni conosce?) nella prima indagine, e dal 48% dopo la campagna di vaccinazione (a Villorba dal 32%). Il morbillo veniva giudicato una grave malattia nell'infanzia dal 36% degli intervistati e non grave dal 39% a Paese nella prima indagine, dal 48% e dal 22% rispettivamente nella seconda indagine ($p < 0,01$); le percentuali corrispondenti per Villorba erano 43% e 30% prima, 57% e 29% dopo ($p > 0,05$). Il 25% degli intervistati a Paese conosceva l'esistenza del vaccino antimorbillo (domanda: esiste il vaccino antimorbillo?) alla prima indagine e l'83% alla seconda; a Villorba le percentuali erano rispettivamente 29% e 54%.

CONCLUSIONI.

I risultati ottenuti in termini di sieroconversione e di valutazione degli effetti collaterali sono in sostanziale accordo con la precedente esperienza nazionale ed internazionale [18-20, 2]: sieroconversione per oltre il 95% dei vaccinati, effetti collaterali di modesta entità, facilmente controllabili e di breve durata. Notevole è risultata la rispondenza della popolazione: nelle indagini campionarie (nessun rifiuto), nelle indagini sierologiche e nella vaccinazione; a dimostrazione di una notevole disponibilità dei cittadini a collaborare con le strutture sanitarie pubbliche nell'attività di prevenzione, quando vengano fornite garanzie di serietà e di operatività. Ottimo il livello di associazione tra test sierologico e ricordo dei genitori, tanto da poter considerare il ricordo capace di selezionare i veri negativi. L'educazione sanitaria deve prima di tutto portare a conoscenza della popolazione della effettiva disponibilità dei servizi e della profilassi. Per quanto sperimentato, le strutture sanitarie pubbliche si sono dimostrate perfettamente in grado di procedere alla esecuzione di un nuovo programma di vaccinazione di massa, quale l'antimorbillosa. Le strutture portanti in questo tipo di programmi dovrebbero essere identificate in quelle che attualmente eseguono le vaccinazioni obbligatorie. L'organizzazione della vaccinazione su tutto il territorio nazionale deve prevedere diversi livelli di coordinamento: nazionale, regionale, USL; il livello del distretto sanitario dovrebbe essere considerato quello

Tabella 3. - Risultati della seconda analisi sierologica.

	A N N I								TOTALI
	1	2	3	4	5	6	7	8	
N. vaccinazioni	103	129	130	131	101	48	30	15	687
Prelievi	79	107	106	106	87	45	29	15	574
% prelievi	76,7	83,0	81,5	80,9	86,1	93,8	96,7	100	83,6
Positivi	77	105	105	105	79	39	27	14	551
% positivi	97,5	98,1	99,1	99,1	90,8	86,7	93,1	93,3	96,0
Tit. geom. M.	20,1	17,3	19,9	20,4	16,4	17,0	13,7	14,7	18,3

direttamente esecutivo. Unità mobili potrebbero sopprimere a particolari difficoltà organizzative o a situazioni di emergenza.

Ringraziamenti.

Si ringrazia:

- il Sindaco del Comune di Paese, On. Sen. Angelo Pavan, per il fattivo sostegno e l'incoraggiamento nello svolgimento

del lavoro e per aver messo a disposizione le strutture amministrative del Comune;

- l'Ufficiale Sanitario, Dott. Pietro Xodo, per la piena collaborazione offerta, soprattutto nella fase della vaccinazione e nella campagna di educazione sanitaria;

- il personale paramedico del Consultorio Pediatrico, per l'assistenza offerta con entusiasmo nella campagna di vaccinazione.

Si ringrazia Ferdinando Timperi e Lucilla Di Pasquale, rispettivamente per l'assistenza tecnica fornita nella elaborazione dei dati e per la stesura dattilografica del testo.

BIBLIOGRAFIA

1. ORENSTEIN, W. A., HALSEY, N. A., HAYDEN, G. F., EDDINS, D. L., CONRAD, J. L., WITTE, J. J., MODLIN, J. F., PREBLUD, S. R., NIEBERG, P. I. & HINMAN, A. R. 1978. Current status of measles in the United States, 1973-1977. *J. Infect. Dis.* **137**: 847-853.
2. HINMAN, A. R., BRANDLING-BENNETT, A. D., BERNIER, R. H., KIRBY, C. D. & EDDINS, D. L. 1980. Current features of measles in the United States: feasibility of measles elimination. *Epidemiol. Rev.* **2**: 153-170.
3. PAULE, C. L., BEAN, J. A., BURMEISTER, L. F. & ISACSON, P. 1979. Postvaccine era epidemiology. *J.A.M.A.* **241**: 1474-1476.
4. SEJDA, J. 1979. Evaluation of the eight-year period of compulsory measles vaccination in the Czech Socialist Republic (CSR). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Prague)*. **23**: 273-283.
5. DITTMAN, S., STARKE, G., OCKLITZ, H. W., GRANHEIS, H. & GIESECKE, H. 1976. The measles eradication programme in the German Democratic Republic. *Bull. WHO*. **53**: 21-24.
6. CELERS, J. 1977. Measles immunization: a ten year report. *Bull. Inst. Pasteur*. **75**: 327-337.
7. SENCER, D. J. & AXNICK, N. W. 1973. Cost Benefit Analysis. International Symposium on Vaccination against Communicable Diseases, Monaco, 1973. *Symp. Series Immunobiol. Standard.*, S. Karger, Basel. **22**: 37-46.
8. KRUGMAN, S. 1979. Measles and mumps immunization: benefit versus risk factors. International Symposium on Immunization: Benefit versus Risk Factors, Brussels 1978. *Develop. Biol. Standard.*, S. Karger, Basel. **43**: 253-257.
9. WIEDERMANN, G. & AMBROSCH, F. 1979. Costs and benefits of measles and mumps immunization in Austria. *Bull. WHO*. **57**: 625-629.
10. ELO, O. 1979. Cost-benefit studies of vaccination in Finland. International Symposium on Immunization: Benefit versus Risk Factors, Brussels 1978. *Develop. Biol. Standard.*, S. Karger, Basel. **3**: 419-428.
11. PONNIGHAUS, J. M. 1980. The cost/benefit of measles immunization: a study from Southern Zambia. *J. Trop. Med. & Hyg.* **83**: 141-149.
12. LANDRIGAN, P. J. & WITTE, J. J. 1973. Neurologic disorders following live measles virus vaccination. *J.A.M.A.* **223**: 1459-1462.
13. KRUGMAN, S. 1977. Present status of measles and rubella immunization in the United States: a medical progress report. *J. Pediatrics*. **90**: 1-12.
14. SANTORO, R., RAPICETTA, M., RUGGERI, F., TAGGI, F., MARIOTTI, S. & GRANDOLFO, M. E. 1978. Morbillo: valutazione della morbosità sulla base dei dati ufficiali e programma di verifica della loro affidabilità, in previsione della campagna di vaccinazione. *Epidemiologia e Prevenzione*. **3**: 39-44.
15. SANTORO, R., RAPICETTA, M. & GRANDOLFO, M. 1980. Indagine sieroepidemiologica sullo stato immunitario della popolazione italiana rispetto al morbillo. *Istituto Superiore di Sanità. Serie Relazioni*, 4/1980: 60 pp.
16. SANTORO, R. 1980. Aspetti generali dell'epidemiologia del morbillo. Atti del XXX Congresso Nazionale di Igiene, 1980. *Igiene Moderna*. (in corso di stampa).
17. RUGGERI, F., SANTORO, R., RAPICETTA, M. & GRANDOLFO, M. E. 1978. Comparison of macro and micro methods in kaolin and RBC treatment of sera used in the measles hemagglutination-inhibition test. *J. Biol. Standard*. **6**: 257-260.
18. MIDULLA, M., BALDUCCI, L., ASCENZIO, A. M., MENICHELLA, V., SEBASTIANI, M. & SABATINO, G. 1976. Vaccinazione contro il morbillo in bambini di età inferiore ad 1 anno o superiore. *Minerva Pediatrica*. **28**: 2425-2428.
19. NARDI, G., BATTISTINI, A., MAZZEO, G., TANZI, M. L. & GRZINCICH, G. L. 1977. Sulla vaccinazione contro il morbillo con virus vivente ed attenuato (Ceppo Schwarz) in un asilo nido. Resistenza di fronte all'infezione naturale. *Ann. Sclavo*. **19**: 1144-1152.
20. TRIVELLO, R., RENZULLI, G., ROMANO, M., MILONE, G. & MOSCHEN, M. E. 1978. Esperimento di vaccinazione contro il morbillo con virus vivo attenuato. (Ceppo Schwarz). *Ann. Sclavo*. **20**: 113-120.

RISULTATI.

Visualizzazione della morfologia cellulare al SEM. - Cellule del clono FF 16-1 altamente sensibile alla FN a 3 ore dall'impianto su dischi Falcon pretrattati con $0,1 \mu\text{gr./cm}^2$ di FN, erano fissati in glutaraldeide ed osservati al microscopio a scansione. Cellule 745 A in sospensione erano studiate in parallelo. Come mostrato nella Fig. 1/a le cellule 745 A appaiono sferiche. La superficie è caratterizzata da protrusioni membranose ondulate e microvilli. La Fig. 1/b mostra cellule FF 16-1 piatte ed allungate. La superficie cellulare è ricca di microvilli. Numerose protrusioni citoplasmatiche contornano la periferia cellulare probabilmente rappresentando aree di adesione specializzata al substrato. Dopo breve trattamento con tripsina il corpo cellulare si retrae mantenendo ancora contatto con il substrato attraverso una fitta e regolare raggiera di protrusioni filamentose (filopodia) (Fig. 1/c).

Correlazione tra la sensibilità alla FN e la capacità di dare tumori nel tessuto sottocutaneo del topo inoculato. - Diversi cloni FF, provenienti da vari stadi di cocoltivazione su fibroblasti (cioè a diverse fasi del processo di selezione) erano classificati sulla base del livello di sensibilità alla FN. Dosi scalari delle cellule dei vari cloni erano inoculate in topi DBA/2 nel sottocute dell'arto posteriore destro. Giornalmente fino al 30° giorno dal trapianto si osservano i topi per la presenza di noduli palpabili nella sede di inoculo. Si calcolava in tal modo la quota minima di cellule trapiantate in grado di dare tumori palpabili nel 50% dei topi inoculati. I due parametri così calcolati, sensibilità alla FN e tumorigenicità, erano riportati in un sistema di assi cartesiani: i cloni si distribuiscono non a caso ma prevalentemente lungo una linea (Fig. 2). Il risultato indica che con alto grado di significatività i due parametri presi in considerazione sono correlati: più alta è la sensibilità alla FN di un clono minore è la potenzialità tumorigenica.

Frequenze di mortalità di topi inoculati per differenti vie con cellule del clono 745 A e FF 16-1. - 10^6 cellule dei cloni 745 e FF 16-1 sono state inoculate rispettivamente per via sottocutanea, intraperitoneale ed endovenosa in gruppi di topi DBA/2 (almeno 15 topi per condizione). La mortalità dei topi trapiantati era calcolata entro un periodo di osservazione di 60 giorni. I risultati sono riportati nella Fig. 3. Le curve di mortalità appaiono variare nettamente con la via di inoculazione adottata. Ciò indica che la via di inoculo svolge un ruolo critico sull'instaurarsi o sul decorso o sull'exitus della malattia neoplastica. La via endovenosa di inoculo risulta la più letale. Ciò risulta sia per le cellule 745 che per il clono FF, con il quale si verifica però una curva di mortalità più rallentata. Per ambedue i cloni saggianti la via intraperitoneale risulta essere quasi del tutto inefficace. La via sottocutanea infine è risultata, anche se tardivamente rispetto alla via venosa, altamente letale per i topi inoculati con le cellule 745, ma quasi inefficace con le cellule FF 16-1. Il riscontro autoptico dei topi inoculati per via venosa ha permesso di evidenziare interessanti criteri differenziali tra la malattia neoplastica determinata da cellule 745 ed FF. All'osservazione macroscopica i topi morti

in seguito al trapianto di cellule 745 presentavano splenomegalia di media entità. Non apparivano palesi segni di localizzazione metastatica a carico dei principali organi, fatta eccezione per piccole infiltrazioni a carico del fegato in 2 topi su 15 animali osservati. In modo

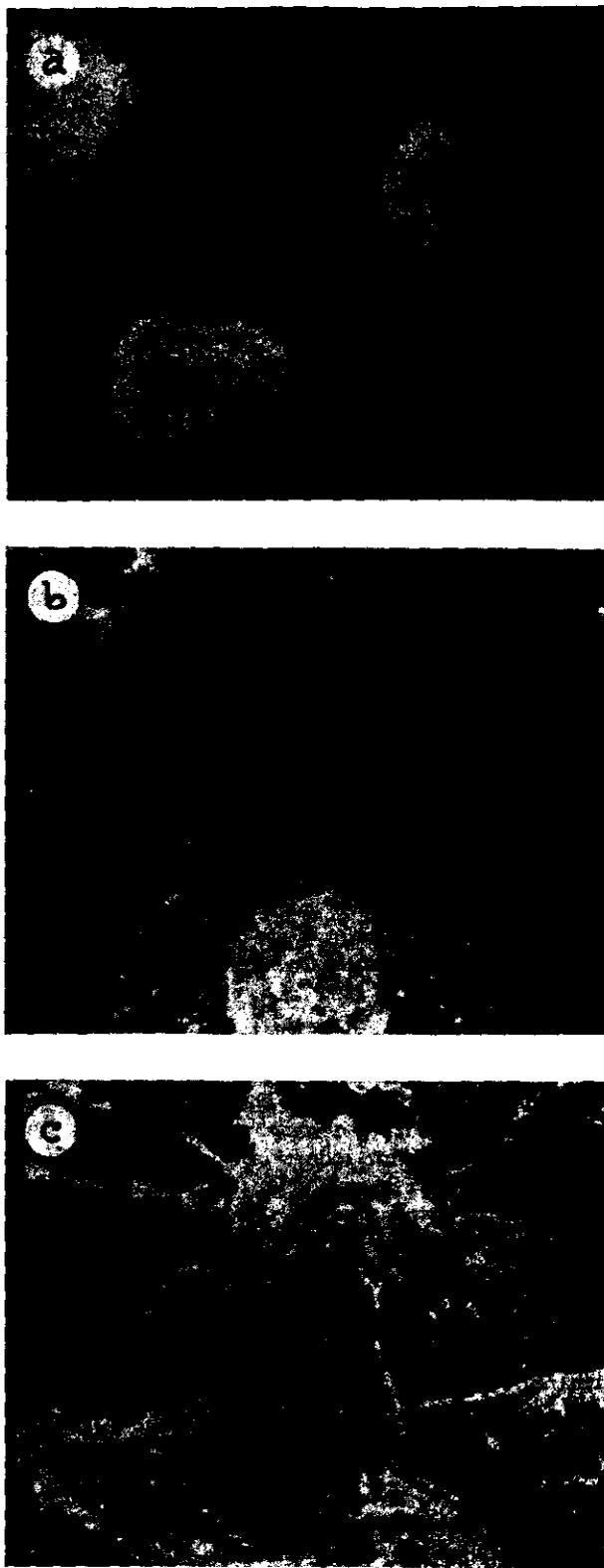


FIG. 1. - Morfologia cellulare al SEM. a) cellule 745 in sospensione; b) cellule FF16-1 adese a substrati pretrattati con FN ($0,1 \mu\text{gr./cm}^2$); c) cellula FF16-1 in iniziale fase di distracco, in seguito a trattamento con tripsina

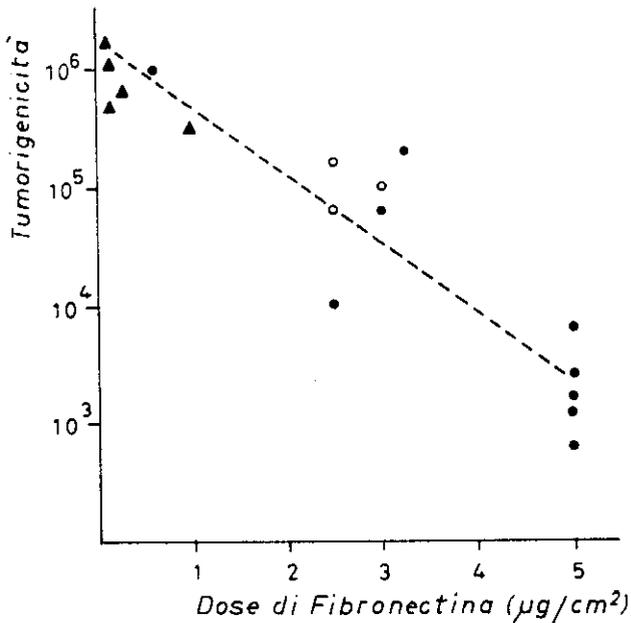


FIG. 2. - Correlazione tra la sensibilità alla FN e la tumorigenicità dei cloni FF. *Ascissa*: sensibilità alla FN espressa come dose di FN (per cm^2), che induce adesione-appiattimento del 50 % delle cellule piastrate. *Ordinata*: dose minima di cellule capace di dare noduli neoplastici nel 50 % di topi inoculati per via sottocutanea. ● = Cloni FF4; ○ = Cloni FF10; ▲ = Cloni FF16

del tutto differente si presentava l'evidenza autoptica dei topi inoculati con le cellule del clono FF 16-1. Solo 3 topi su 15 presentavano modica splenomegalia. Tutti gli animali osservati presentavano evidenti segni di localizzazione metastatica epatica. Nella maggioranza dei topi, il fegato appariva deformato da grossi noduli biancastri (da 1 a 4-5 mm di diametro) circondati da membrana fibrosa e contenenti quasi esclusivamente cellule di Friend.

L'esame istologico dei fegati di topi inoculati con cellule 745 ed FF 16-1 conferma il carattere di diffe-

renziale epatotropicità dei due stipiti leucemici. Come appare nella Fig. 4/a la morfologia degli elementi cellulari epatici e la loro topografia appare nei limiti della norma nel topo inoculato con lo stipite cellulare 745. Solo in una parte degli animali inoculati (circa il 60 %) infiltrati neoplastici erano identificabili (Fig. 4/b). La pressoché totalità dei topi inoculati con cellule FF 16-1 presentava la struttura del tessuto epatico completamente sovvertita: la massiva infiltrazione leucemica sostituiva quasi completamente la cellularità epatica.

DISCUSSIONE.

Il lavoro presenta evidenza sperimentale che le cellule FLC posseggono una variabile capacità di interagire con le molecole di FN, adsorbite sulle superfici di coltura e che tale capacità ha profonde implicazioni per quanto concerne l'espressione maligna delle cellule inoculate nel topo DBA/2. Le più rilevanti conclusioni raggiunte possono essere così descritte:

1) l'acquisizione della sensibilità alla FN si accompagna a riduzione del potenziale oncogeno;

2) il carattere di sensibilità alla FN del clono FF 16-1 si accompagna a spiccata specificità metastatica per il fegato;

3) le cellule leucemiche, reisolte dai tumori FF, sia nel sottocute [7] che nei noduli metastatici epatici (osservazioni non mostrate), mantengono il livello di sensibilità alla FN proprio delle cellule inoculate. Ciò costituisce una prova che le cellule FF sono intrinsecamente maligne, ed esclude la possibilità che i tumori derivino da retromutazioni *in vivo* di cellule FF nella direzione del fenotipo originale 745 A.

Al momento, non abbiamo elementi di certezza sperimentale atti ad individuare i meccanismi biologici che regolano la complessa relazione tra sensibilità alla

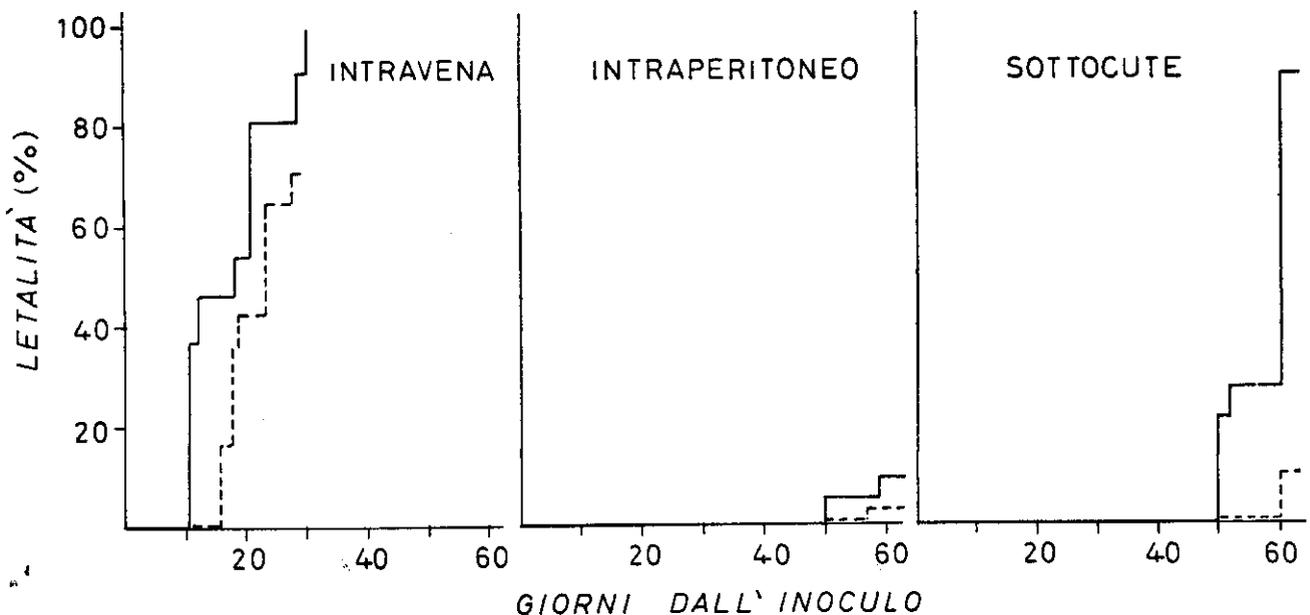


FIG. 3. - Curve di letalità di topi inoculati con 10^6 cellule 745 ed FF per diverse vie. — 745 A; - - - FF16-1

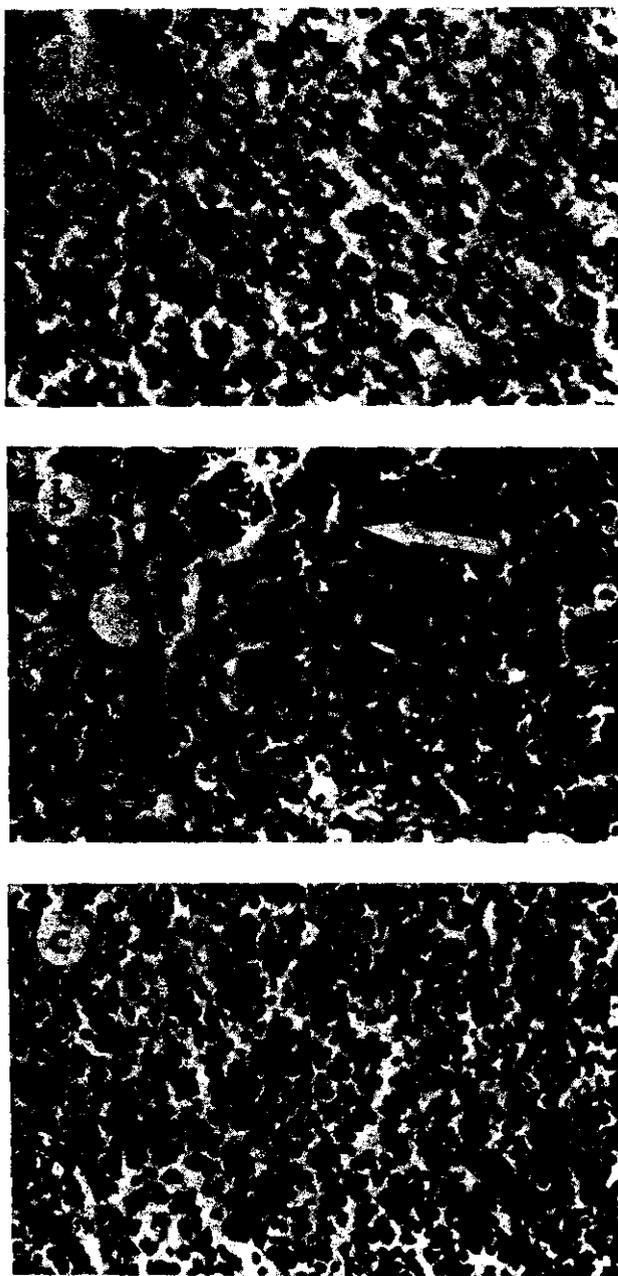


FIG. 4. - Istologia del fegato di topi DBA/2, inoculati per via venosa con 10^6 cellule. a) fegato di topo inoculato con cellule 745 A; b) fegato di topo inoculato con cellule 745 A; la freccia indica l'infiltrato leucemico; c) completa perdita della struttura epatica per massiva infiltrazione leucemica nel topo inoculato con cellule FF16-1

FN delle cellule e la tessuto-dipendenza del processo oncogenico. Quali sono i fattori che determinano la ridotta crescita cellulare del clono FF e, viceversa, la sua eccezionale riproducibilità nel fegato?

Le curve di crescita in monostrato delle cellule FF su substrati trattati con FN hanno dimostrato che la fibronectina provoca topoinibizione *in vitro* [7]. Questo dato potrebbe spiegare la ridotta moltiplicazione cellulare nel sottocute, data la ricchezza in FN di questo tessuto. Altri fattori potrebbero però essere in gioco nel determinare la riduzione del potere oncogeno delle cellule FF nel sottocute. La sensibilità alla fibronectina potrebbe comportare un'aumentata interazione tra FN e superficie cellulare anche attraverso una più elevata deposizione di FN plasmatica nello spazio intercellulare. Il potere opsonico di cui è dotata la FN [8] potrebbe esaltare l'attività macrofagica nel sito d'inoculo con conseguente rigetto del trapianto. Ben più difficile a noi sembra avanzare ipotesi in grado di spiegare l'epatotropismo delle cellule FF. I fattori in gioco sono senz'altro multipli e complessi. Le cellule sensibili alla FN potrebbero conglutinare nel torrente circolatorio per interazione con la forma plasmatica della FN. Gli agglutinati leucemici potrebbero arrestarsi nei capillari sinusoidali epatici. Questa ipotesi presupporrebbe l'iniziale specificità di arresto delle cellule FF, inoculate per via venosa, nel fegato. Valuteremo questa possibilità studiando la distribuzione cellulare dopo inoculo intravenoso nei vari organi, utilizzando cellule marcate con 5-fluorodesossipurina.

Una seconda ipotesi alternativa può essere avanzata. Il fegato esercita un effetto positivo sulla replicazione delle cellule FF, che raggiungono l'organo per via circolatoria. A tale riguardo, sembra importante rilevare che il fegato è l'organo centrale deputato al catabolismo della fibronectina plasmatica [9]. Frammenti peptidici risultanti dall'attacco proteasico alla molecola di FN sono stati dimostrati svolgere un ruolo favorente sullo stato trasformato della cellula neoplastica [10]. La serie di fenomeni da noi evidenziati ha, a nostro parere, un potenziale interesse teorico sul ruolo svolto dalla FN, proteina prodotta dal sistema reticolo-endoteliale e distribuita in tutti gli organi e tessuti, sull'evoluzione della malattia neoplastica.

La ricerca è stata in parte finanziata dal Progetto Finalizzato « Controllo della crescita neoplastica », (Contratto n. 82.00406.96) del C.N.R., Roma.

BIBLIOGRAFIA

1. THOMSON, S. & AXELRAD, A. A. 1968. A quantitative spleen colony assay method for tumor cells induced by Friend leukemia virus infection in mice. *Cancer Res.* 28: 2105-14.
2. ROSSI, G. B. & FRIEND, C. 1970. Further studies on the biological properties of Friend virus-induced leukemic cells differentiating along the erythrocytic pathway. *J. Cell. Physiol.* 76: 159-66.
3. DIETZ, M., FOUCHÉY, S. P., LONGLEY, C., RICH, M. A. & FURMANSKI, P. 1977. Spontaneous regression of Friend virus-induced erythroleukemia. *J. Exp. Med.* 145: 594-606.
4. TAMBOURIN, P., WENDLING, F., MOREAU-GACHELIN, F., CHARON, M. & BUCAU-VARLET, P. 1980. Friend leukemia: a multi-step malignant disease. In: *In Vivo and in Vitro erythropoiesis: The Friend system*. G. B. Rossi (Ed.). Elsevier, North Holland, pp. 127-138.

5. BELARDELLI, F., GRESSER, I., MAURY, C. & MAUNOURY, M. T. 1982. Antitumor effects of interferon in mice injected with interferon-sensitive and interferon-resistant Friend leukemia cells. *Int. J. Cancer*. **30**: 813-20.
6. BENEDETTO, A., AMICI, C., DJACZENKO, W., ZANIRATTI, S. & SANTORO, M. G. 1981. Role of fibronectin in the adhesion of Friend erythroleukemia cells. DMSO-induced production of hemoglobin in adherent, flattened cells. *Exp. Cell Res.* **134**: 219-29.
7. BENEDETTO, A., AMICI, C., DJACZENKO, W., ZANIRATTI, S. & ELIA, G. 1982. Acquisition of sensitivity to exogenous fibronectin by Friend leukemia cells correlates with reduction of their tumorigenic potential. *Int. J. Cancer*. **30**: 663-67.
8. BLUMENSTÖCK, F. A., SABA, T. M., WEBER, P. & LAFFIN, R. 1978. Biochemical and immunochemical characterization of human opsonic α 2SB glycoprotein: its identity with cold insoluble globulin. *J. Biol. Chem.* **253**: 4287-94.
9. YAMADA, K. M. & OLDEN, K. 1978. Fibronectins: adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*. **275**: 179-84.
10. DE PETRO, G., BARLATI, S., VARTIO, T. & VAHERI, A. 1981. Transformation-enhancing activity of gelatin-binding fragments of fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **78**: 4965-69.

II Sessione: *Batteriologia-micologia*

Relazione

Specificità e meccanismo d'azione delle tossine batteriche

ANGELA BATTISTINI (a), MAURIZIO TOMASI (b) e GIULIANO D'AGNOLO (b)

(a) Segreteria per le Attività Culturali; (b) Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - *L'agente etiologico di alcune malattie infettive è una tossina specifica prodotta dal microrganismo infettante. Le quattro malattie più comuni dovute all'azione di una tossina proteica sono il colera, il tetano, la difterite ed il botulismo. Nonostante che le tossine responsabili di queste malattie presentino bersagli cellulari molto diversi tra loro, vi sono alcune generalizzazioni che possono essere fatte sul loro meccanismo d'azione. Possono infatti essere usate quali precisi strumenti di indagine di meccanismi cellulari a livello molecolare. Questa rassegna contiene una breve discussione sulle proprietà comuni delle tossine batteriche e sulle loro applicazioni a studi di fenomeni biologici complessi.*

Summary (Specificity and Action Mechanism of Bacterial Toxins). - *In several infectious diseases death can be due to a specific toxin produced by the invading micro-organisms. There are four well-known diseases caused by such a toxin: cholera, tetanus, diphtheria and botulism. These toxins have very different cellular activities but, in spite of this, they have also some interesting similarities. The purified toxins can be used as precise tools for unraveling complex cellular mechanisms. In this review, we discuss briefly the generalizations that can be made about the way they work and the structural properties that they have in common.*

L'identificazione di sostanze tossiche quali responsabili del quadro clinico delle infezioni prodotte da batteri patogeni, ha richiamato l'attenzione dei ricercatori attraverso tutta la storia della medicina. Nel corso degli ultimi anni tuttavia, l'interesse scientifico si è andato spostando dagli aspetti patologici e clinici alla possibilità di utilizzare le tossine batteriche, ed in particolare quelle di natura proteica e termolabile, quali precisi strumenti di indagine dei fenomeni biologici complessi. La loro azione sugli organi bersaglio può infatti essere considerata selettiva, dal momento che coinvolge funzioni cellulari specifiche ed essenziali alla fisiologia della cellula stessa. Tali tossine differiscono, invece, tra di loro per quanto concerne la specificità tissutale.

Alcune, come la tossina tetanica, hanno una specificità univoca per il tessuto bersaglio [1]. Il meccanismo con cui questa tossina risale dalle terminazioni nervose, attraverso la corda spinale, fino ad interagire

con i recettori interrompendo delle funzioni specifiche, fornirà nuove conoscenze sul funzionamento del sistema nervoso. Allo stesso gruppo ad alta specificità tissutale appartiene probabilmente anche la tossina isolata recentemente da *Shigella shigae*, che inibisce la sintesi proteica solo in alcune cellule epiteliali di primate [2, 3].

Altre tossine presentano invece minore specificità tissutale; tra queste la tossina difterica che, avendo la capacità di riconoscere qualche struttura poco differenziata sulla membrana, agisce su molte cellule eucariotiche. È stata, infatti, avanzata l'ipotesi che la tossina difterica riconosca le teste polari di alcuni fosfolipidi di membrana [4]. Tuttavia, anche la tossina difterica conserva un'alta selettività per quanto riguarda il suo bersaglio intracellulare; ha infatti come unico substrato il fattore della sintesi proteica EF-2, che viene inattivato a seguito di una ADP-ribosilazione a carico del NAD⁺ (Fig. 1). Il trasferimento enzimatico dell'ADP-ribosio dal NAD⁺ all'EF-2 avviene con la formazione di un legame covalente glicosidico tra ADP-ribosio ed un derivato complesso dell'istidina [5], la 2-[3-carbossiammido-3-(trimetilammonio)propil] istidina o diftamide (Fig. 2). La specificità della tossina tuttavia non è definita solamente da questo aminoacido ma da qualcosa di più complesso, dal momento che i peptidi contenenti diftamide, isolati da digesti triptici, non vengono ADP-ribosilati. Dato che la tossina ADP-ribosila gli EF-2 di tutti gli eucarioti, la diftamide deve essere stata conservata invariata nel corso dell'evoluzione. Sebbene questo aminoacido sia stato fi-

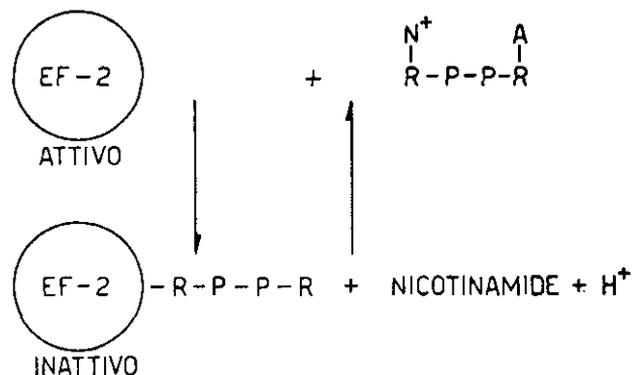
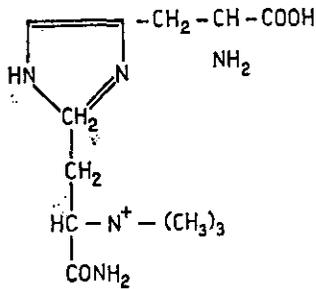


FIG. 1. - ADP-ribosilazione dell'EF-2



2-[3-CARBOSSIAMIDO-3-(TRIMETILAMMONIO) PROPIL] ISTIDINA

FIG. 2. - Struttura della diftamide

nora isolato solamente dal fattore EF-2, è difficile credere che una struttura così complessa si sia evoluta solamente per fornire un substrato alla tossina difterica. La diftamide dovrebbe quindi essere essenziale per il funzionamento dell'EF-2, anche se, sorprendentemente, mutanti che ne sono privi non hanno alcun difetto apparente nella sintesi proteica.

La diftamide è, probabilmente, il substrato anche della tossina della *Pseudomonas aeruginosa*, che ha attività simile alla tossina difterica, ma non è il substrato della tossina colerica (CLT) o della tossina termolabile (LT) dell'*Escherichia coli*, che ADP-ribosilano proteine differenti. Queste ultime appartengono ad un terzo gruppo di tossine ad ancor più bassa specificità tissutale, capaci cioè di interagire con tutte le cellule contenenti gangliosidi nella membrana. Questa proprietà conferisce loro la caratteristica di veri e propri reattivi chimici nei confronti di tali cellule, nelle quali stimolano l'adenilciclastasi di membrana provocando un aumento dell'AMP ciclico (cAMP) intracellulare [7, 8].

La tossina colerica, utilizzando il NAD^+ come substrato ADP-ribosila la subunità regolatoria (S_R) dell'adenilciclastasi, che normalmente è sotto controllo ormonale. L'attivazione dell'adenilciclastasi, ad opera degli ormoni, avviene dopo il legame del GTP citoplasmatico alla subunità regolatoria dell'enzima. L'idrolisi del GTP legato a GDP ne causa il rilascio dal sito di interazione, provocando il conseguente ritorno dell'attività dell'adenilciclastasi al livello di base (Fig. 3). Questa stimolazione è molto rapida: il livello di cAMP cresce in pochi minuti e dopo aver raggiunto un massimo decresce rapidamente ad opera della fosfodiesterasi. La tossina colerica, invece, per catalizzare l'ADP-ribosilazione della subunità regolatoria richiede un periodo di tempo variabile da quindici minuti a due ore, a seconda del tipo di cellule esaminate. La subunità regolatoria poi, una volta modificata, non è più capace di idrolizzare il GTP legato, e mantiene così attivo l'enzima anche per parecchi giorni, fino a quando cioè la subunità modificata non viene sostituita da molecole di subunità nativa attraverso i processi del ricambio cellulare. Questa lunga stimolazione temporale è la causa della perdita di acqua ed elettroliti che si osserva nella manifestazione clinica del colera.

Le tossine sopracitate, pur costituendo esempi significativi delle differenze esistenti nelle specificità tissutale e nel meccanismo d'azione, presentano alcune analogie interessanti e particolarmente stimolanti nello stu-

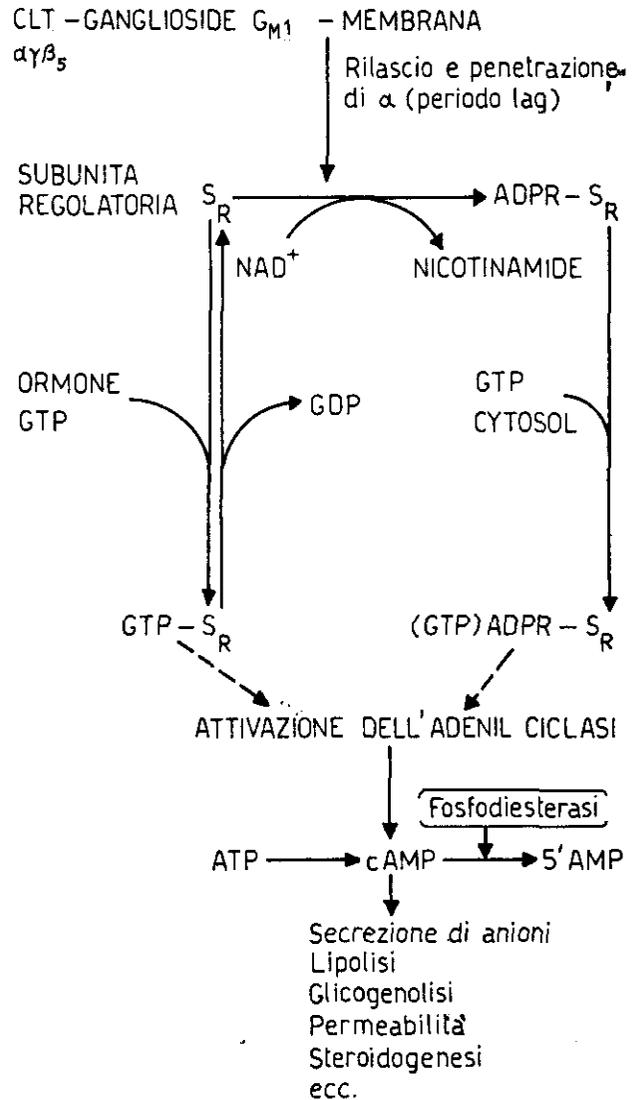


FIG. 3. - Attivazione dell'adenilciclastasi da parte della tossina colerica

dio dei meccanismi cellulari. Infatti, in tutti gli esempi citati, la regione molecolare della tossina coinvolta nel riconoscimento cellulare e quindi nel legame ai recettori di membrana è strutturalmente distinta dalla regione funzionale, che dà alla tossina la capacità catalitica di esercitare effetti biologici specifici (Fig. 4). Inoltre, le due regioni funzionali A (activity) e B (binding) sono unite da un ponte disolfuro, la cui riduzione causa il rilascio della regione A, favorendone la successiva interazione con il bersaglio cellulare. Le analogie strutturali, schematizzate in Fig. 4, suggeriscono che tossine diverse tra loro possano avere in comune i meccanismi utilizzati per penetrare nella cellula. Infatti, una volta che la tossina si è legata alla superficie esterna della membrana cellulare attraverso la regione funzionale B, la regione funzionale A, prima di poter esercitare il proprio effetto tossico, deve penetrare nella cellula. I meccanismi di penetrazione possibili sono due: la regione A attraversa la membrana da sola o con un carrier, o la attraversa per endocitosi, nel qual caso resterebbe comunque irrisolto il problema del successivo passaggio nel citoplasma. Per

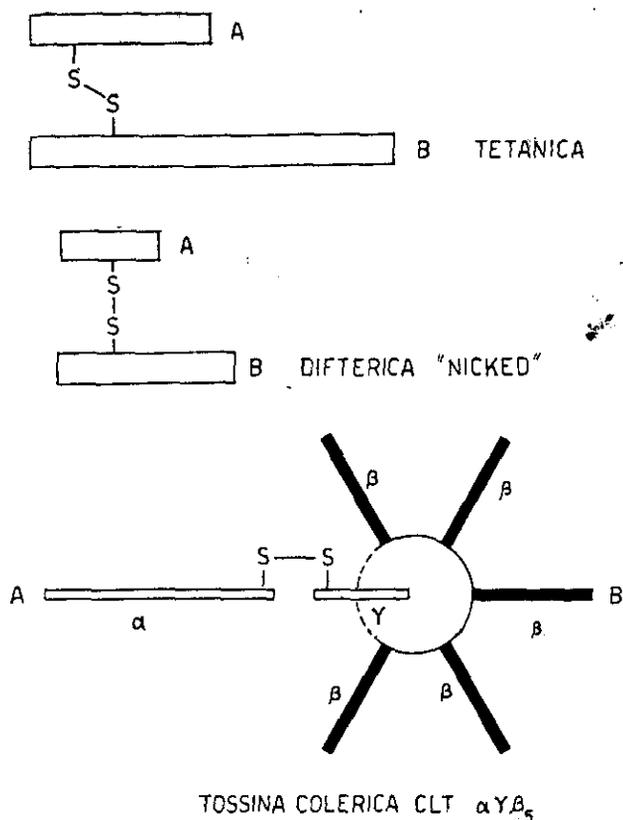


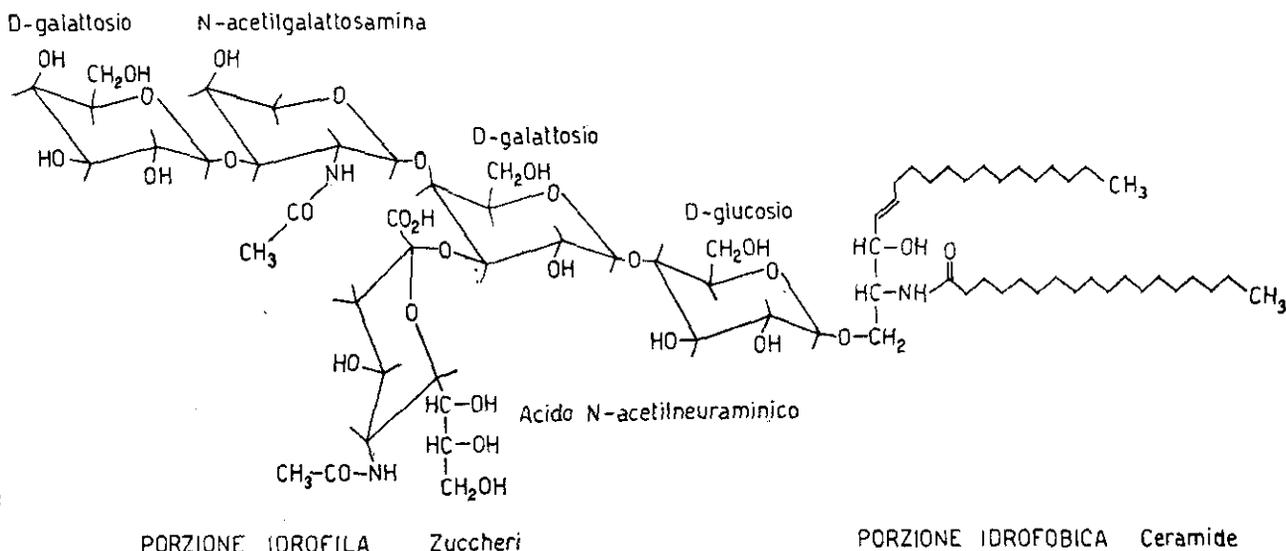
FIG. 4. - Struttura schematica di alcune tossine

questa ed altre ragioni l'endocitosi è stata abbandonata come ipotesi in favore di altre che esamineremo soprattutto alla luce di alcuni esperimenti condotti con la tossina colerica.

Il primo evento nell'azione della tossina colerica è il legame rapido e praticamente irreversibile ai recettori della superficie cellulare. Il recettore biologico della tossina colerica è il ganglioside G_{M1} (Fig. 5), al quale si legano le catene polipeptidiche β . Ciascuna catena polipeptidica β ha un sito di legame, per cui una molecola di tossina, che ha formula molecolare $\alpha\gamma\beta_5$,

è capace di legare cinque molecole di G_{M1} (Fig. 4). Essenziali per la formazione del legame sono l'acido sialico ed il galattosio, situati nella posizione strutturale che occupano nella molecola del G_{M1} . Infatti, altri gangliosidi, strutturalmente differenti per la posizione del galattosio e dell'acido sialico, non sono in grado di legare la tossina colerica [9]. Dopo il legame, l'attività catalitica della tossina colerica viene esplicita solamente in seguito alla riduzione del ponte di solfuro che unisce le catene polipeptidiche γ e α (Fig. 6). Infatti, il protomero A, isolato per dissociazione dalla tossina colerica con agenti denaturanti, non è attivo se non dopo la riduzione. Tuttavia gli eventi molecolari, che hanno luogo nel periodo lag, che intercorre tra legame della tossina alla membrana ed attivazione catalitica dell'adenilciclasa, durante il quale una proteina idrosolubile come la tossina colerica è capace di superare la barriera idrofobica lipidica della membrana cellulare, non sono ancora noti. Sono stati proposti al riguardo diversi meccanismi. Alcuni autori [8, 9] ritengono che il legame multivalente di una molecola di tossina colerica a cinque molecole di ganglioside G_{M1} possa provocare un'alterazione o della struttura lipidica e/o della struttura proteica tali da provocare l'inserimento nella membrana del protomero A. Altri ritengono, invece, che una modifica dei legami covalenti che uniscono le regioni funzionali della tossina siano una condizione essenziale per la penetrazione della catena catalitica α . Questi modelli implicano inoltre un ruolo diverso attivo o passivo del protomero B.

L'utilizzazione di sostanze in grado di fotomarcare selettivamente la regione idrofobica o quella idrofila delle proteine di membrana, ha recentemente permesso di ottenere ulteriori informazioni sul meccanismo di interazione tra le due regioni funzionali della tossina colerica e la membrana cellulare ed anche sul meccanismo di penetrazione nella membrana stessa. Queste sostanze, schematizzate in Fig. 7, sono due fosfatidilcoline sintetizzate dal Dr. Cesare Montecucco, Istituto di Patologia Generale, Università di Padova, che hanno il gruppo fotoattivabile nitroarilazido in due diverse posizioni e sono capaci di inserirsi nel doppio strato lipidico delle membrane naturali e di quelle artificiali [16]. Illuminando con luce ultraviolet-

FIG. 5. - Struttura del ganglioside G_{M1}

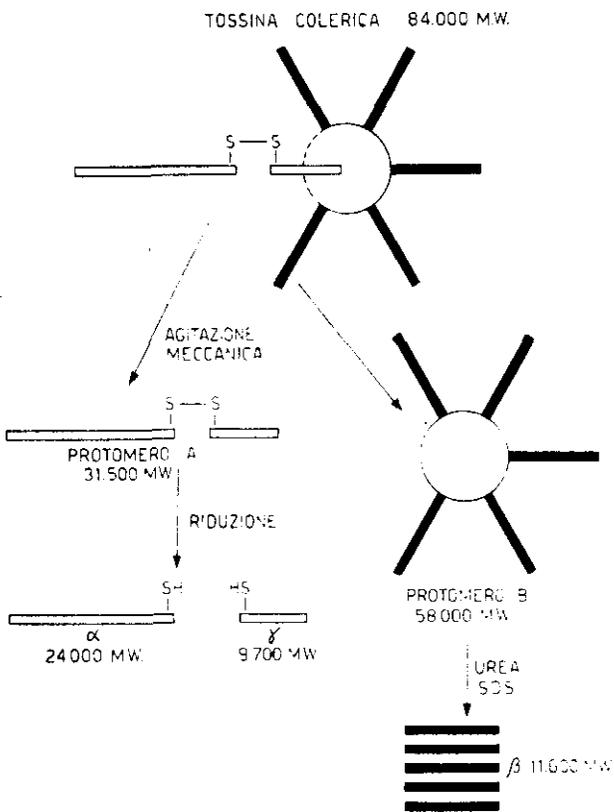


FIG. 6. - Struttura schematica delle subunità costituenti la tossina colerica

letta, il gruppo azido ($O-N_3$) viene convertito in un intermedio molto reattivo ($O-N$, nitrene) che si lega in modo covalente ai gruppi $-OH$ e $-NH_2$ delle molecole vicine. Se queste sono proteine, i polipeptidi che le costituiscono intercalati nel doppio strato lipidico vengono marcati e possono essere analizzati per elettroforesi [11].

Il fosfolipide I, che possiamo definire reattivo superficiale, ha il gruppo fotoreattivo (indicato con una freccia in Fig. 7) a livello della testa polare e reagirà solo con le regioni proteiche che interagiscono superficialmente con il doppio strato lipidico, mentre il fosfolipide II, che possiamo definire reattivo profondo, marcherà le regioni proteiche inserite nel cuore idrofobico del doppio strato. Facendo interagire la tossina colerica con membrane artificiali contenenti questi com-

posti radioattivi e fotoreattivi, in assenza di agenti riducenti, con il fosfolipide I si marca solo la catena β e poco la catena α che è probabilmente mascherata da β . Nessuna catena polipeptidica si marca con il reattivo profondo, il fosfolipide II. In presenza di agenti riducenti, invece, tutte le catene polipeptidiche della tossina risultano marcate dal fosfolipide I, ma solo la catena α viene marcata dal reattivo profondo. Questi risultati indicano che, dopo riduzione, la catena α , responsabile dell'attivazione dell'adenilciclastasi e quindi della tossicità della molecola, è capace di penetrare profondamente nel doppio strato lipidico. In altre parole, il semplice legame della tossina con la cellula non è sufficiente per indurre una riorganizzazione della sua stessa struttura, tale da permettere l'interazione della catena α con il doppio strato lipidico e la sua penetrazione nella membrana. L'intervallo di tempo che intercorre tra il legame alla membrana e l'attivazione dell'adenilciclastasi è presumibilmente necessario per delle modifiche covalenti della struttura proteica, quali la riduzione del ponte disolfuro e la separazione della regione catalitica α dalla regione di legame $\gamma\beta$.

Anche se la natura degli agenti coinvolti in questi processi non è ancora nota, la riduzione di proteine è stata descritta sia sulla superficie interna che su quella esterna della membrana cellulare [12, 13]. I nostri risultati rafforzano l'idea che la riduzione, a livello di membrana, del ponte disolfuro intracatena, giochi un ruolo cruciale nell'ingresso delle tossine nelle cellule. Una migliore comprensione del ruolo strutturale e biologico del ponte disolfuro che unisce le due regioni funzionali delle tossine batteriche, ottenibile con le tecniche impiegate, permetterà sia di definire i meccanismi di penetrazione delle tossine nelle cellule sia di indirizzare queste molecole verso obiettivi specifici come le cellule tumorali. È già possibile infatti costruire delle proteine-chimera in cui la catena A, ad esempio della tossina difterica, è legata attraverso il ponte disolfuro ad una immunoglobulina specifica [14]. Questo complesso è risultato tossico contro una linea linfoblastoide umana in coltura, che pure era insensibile alla tossina difterica. Anche se molti problemi permangono ancora nell'impiego delle tossine-chimera come agenti terapeutici, il chiarimento delle proprietà del ponte disolfuro che unisce la regione tossica alla regione di legame, ha già consentito di intraprendere i primi passi nella direzione del raggiungimento di quella specificità e selettività di cui sono privi i farmaci antitumorali oggi disponibili.

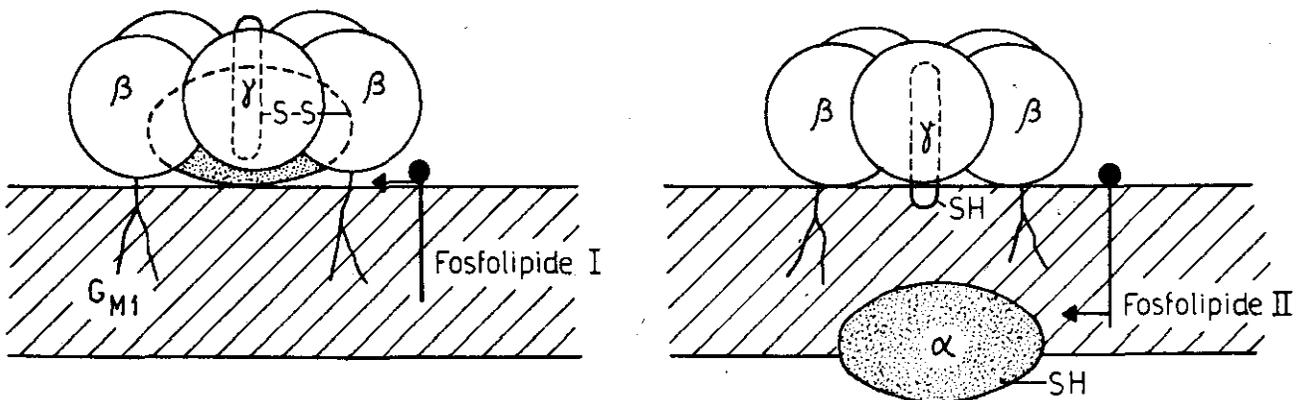


FIG. 7. - Diagramma schematico della fotomarcatura idrofobica della tossina colerica

BIBLIOGRAFIA

1. BIZZINI, B. 1977. Tetanus toxin structure as a basis for elucidating its immunological and neuropharmacological activities in: *The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins*. P. Cuatrecasas (Ed.). Chapman and Hall, Londra, pp. 177-217.
2. OLSNES, S., REISBIG, R. & EIKLID, K. 1981. Subunit structure of *Shigella* Cytotoxin. *J. Biol. Chem.* **256**: 8732-8738.
3. REISBIG, R., OLSNES, S. & EIKLID, K. 1981. The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. *J. Biol. Chem.* **256**: 8739-8744.
4. ALVING, C. R., IGLEWSKI, B. H., URBAN, K. A., MOSS, J., RICHARDS, R. L. & SADOFF, J. C. 1980. Binding of diphtheria toxin to phospholipids in liposomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **77**: 1986-1990.
5. OPPENHEIMER, N. J. & BODLEY, J. W. Diphtheria toxin. Site and configuration of ADP ribosylation of diphthamide in elongation factor 2. *J. Biol. Chem.* **256**: 8579-8581.
6. LEPLA, S. M., MARTIN, O. C. & MUEHL, L. A. 1978. The exotoxin of *P. aeruginosa*: a proenzyme having an unusual mode of activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 532-538.
7. FINKELSTEIN, R. A. 1973. Cholera. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **2**: 552-623.
8. BRADY, R. O. & FISHMAN, P. H. 1979. Biotransducers of membrane-mediated information. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **50**: 303-323.
9. VAN HEYNINGEN, S. 1977. Cholera toxin. *Biol. Rev.* **52**: 509-549.
10. TOMASI, M. & MONTECUCCO, C. 1981. Lipid insertion of cholera toxin after binding to G_{M1} -containing liposomes. *J. Biol. Chem.* **256**: 11177-11181.
11. BAYLEY, M. & KNOWLES, J. R. 1977. Photoaffinity labeling in *Methods in Enzymology*. W. B. Jakoby & M. Wilchek (Ed.). Academic Press, Londra. XLVI: 69-114.
12. HOLMGREN, A. 1981. Thioredoxin: structure and function. *Trends Biochem. Sci.* **6**: 26-29.
13. VARANDANS, P. T. 1972. Insulin degradation. Purification and properties of glutathione-insulin transhydrogenase of rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* **286**: 126-135.
14. ROSS, W. C. J., THORPE, P. E., CUMBER, A. J., EDWARDS, D. C., HINSON, C. A. & DAVIES, A. J. S. 1980. Increased toxicity of Diphtheria toxin for human Lymphoblastoid Cells following Covalent Linkage to anti-(human lymphocyte) Globulin or 15 F(ab')₂ fragment. *Eur. J. Biochem.* **104**: 381-390.

Effetto della concanavalina A sulla interazione cellulare della abrina e della ricina

MANUELA SORRENTINO (a), CARLA AMICI (a), FILIPPO BELARDELLI (b),
CARLO DELFINI (a) e GOFFREDO OBERHOLTZER (a)

(a) Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia; (b) Servizio Biologico, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - La tossicità dell'abrina e della ricina in cellule leucemiche di Friend e in cellule HeLa è significativamente ridotta dal trattamento con Con A. Per chiarire il meccanismo dell'effetto protettivo indotto dalla Con A abbiamo studiato il legame e il rilascio della tossina. Le cellule trattate con Con A mostrano un aumento della quantità totale di tossina associata alle cellule, ma una marcata diminuzione di entrata della tossina nel citoplasma. Nelle cellule trattate con Con A è ridotto il rilascio della tossina nel terreno di coltura, rispetto alle cellule di controllo. Inoltre, la tossina rilasciata non è degradata ed è ancora biologicamente attiva. Il trattamento con lattosio, che inibisce il legame de novo della tossina eluita, determina una riduzione dell'attività tossica, similmente al trattamento con Con A. I nostri risultati suggeriscono che la Con A riduce il numero dei cicli legame-internalizzazione-eluzione della tossina, causando, rispetto ai controlli, una più bassa probabilità di entrata della tossina nel citoplasma.

Summary (Effect Concanavalin A on the Interaction of Abrin and Ricin with Friend and HeLa Cell Lines). - *Abrin and ricin toxicity on Friend Leukemia Cells and HeLa cells is significantly reduced by Con A treatment. In order to clarify the mechanism of Con A-induced protective effect, the toxin uptake and release were studied. Con A treated cells show an increase of the toxin bulk uptake, but a marked decrease of the toxin entry into the cytosol. The toxin release into the medium is reduced in Con A treated cells with respect to control cells. Moreover the eluted toxin is not degraded and is still biologically active. Lactose treatment which inhibits the de novo binding of eluted toxin produces a reduction of toxin activity similar to Con A treatment. Our results suggest that Con A decreases the number of toxin binding-uptake-elution cycles, causing there by a lower probability of toxin entry into the cytosol with respect to control cells.*

INTRODUZIONE.

Il primo step nel processo di internalizzazione di lectine tossiche, quali l'abrina e la ricina, è il legame della regione B della tossina ai recettori contenenti galattosio presenti sulla superficie cellulare. Solo in seguito a questo legame, la regione A della tossina è capace

di entrare nel citoplasma, inattivando la subunità ribosomiale 60 S ed inibendo così la sintesi proteica cellulare [1]. Il meccanismo di questo processo di internalizzazione non è ancora stato chiarito. Come possibili meccanismi sono state suggerite la pinocitosi aspecifica [2] e l'endocitosi mediata da recettori [3]. Eiklid e Coll. [4] hanno dimostrato recentemente che la presenza nel citoplasma di una singola molecola di tossina è sufficiente ad uccidere la cellula, indicando che l'efficienza di entrata della tossina nel citoplasma è molto bassa rispetto alla quantità totale di tossina associata alla cellula. D'altra parte, è stato dimostrato che parte della tossina internalizzata viene rilasciata dalle cellule in forma apparentemente intatta, indicando che essa è riciclata con la membrana cellulare [2]. Per chiarire il fenomeno d'internalizzazione della tossina possono essere usati agenti capaci di interferire con il normale processo di intossicazione.

Noi avevamo precedentemente dimostrato che la tossina colerica, la sua subunità B ed alcune lectine (Concanavalina A e Wheat Germ Agglutinin) possono inibire l'attività della ricina e della abrina in cellule HeLa [5, 6]. In particolare la Concanavalina A (Con A) è una lectina multivalente capace di inibire il *patching* e il *capping* di molti recettori della superficie cellulare [7], di modificare la mobilità della membrana cellulare [8, 9] e l'attività dei lisosomi [10]. In questo lavoro abbiamo analizzato il meccanismo dell'inibizione indotta dalla Con A sull'attività della abrina e della ricina in linee cellulari murine ed umane.

MATERIALI E METODI.

Culture cellulari. - Cellule leucemiche di Friend (FLC) (clone 745/A) in sospensione e cellule HeLa in monocoltura erano coltivate in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplementato con il 10% di siero fetale di vitello (Gibco, Grand Island, New York, USA).

Tossine. - L'abrina e la ricina, purificate come descritto da Nicolson e Blaustein [11], erano marcate con Na ¹²⁵I (Radiochemical Centre, Amersham, England), utilizzando la tecnica della lactoperossidase-glucosiosidase in stato solido (Bio-Rad Laboratories, Rich-

mond, California, USA). Le tossine iodinate erano ulteriormente purificate per cromatografia su Sephadex G-25 superfine per rimuovere le molecole eventualmente distrutte durante la marcatura. La marcatura generalmente procedeva al livello di $7,2 \times 10^5$ cpm/ μ g di proteina. La radioattività era misurata in un Ultragramma LKB 1280.

Inibizione della sintesi proteica. - Le cellule HeLa erano seminate 24 ore prima dell'esperimento in piastre Linbro da 24 pozzetti (3×10^5 cellule per pozzetto). I monostrati confluenti di cellule HeLa o 2×10^6 cellule/ml di FLC in provette di plastica (Falcon) erano incubati a 37 °C con o senza 50 μ g/ml di Con A (Miles Laboratories, Elkhart, USA). Dopo 1 ora, le cellule venivano lavate due volte e trattate per 3 ore a 37 °C con concentrazioni crescenti di tossina. Dopo 3 lavaggi, le cellule erano incubate per 1 ora a 37 °C con terreno contenente 0,2 μ Ci/ml di L-(4-5- 3 H)-leucina (Radiochemical Centre, Amersham, England). Alla fine della marcatura le cellule venivano lavate e disciolte con 0,2 ml di SDS 2% - NaOH 0,1 M; quindi veniva aggiunto TCA fino alla concentrazione finale del 10% (w/v) e misurata la radioattività incorporata nel materiale acido precipitabile con un Ultrabeta LKB 1210.

Frazionamento cellulare. - Il frazionamento cellulare era condotto come descritto da Gazitt e Friend [12]. 5×10^6 cellule venivano lisate in 2,5 ml di tampone Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, contenente $MgCl_2$ 2,5 mM a 0 °C. Dopo 10 minuti i *debris* cellulari erano centrifugati a 100 xg per 5 minuti. Il sovrinatante (*cytosol*) era ulteriormente centrifugato per 1 ora a 100,000 xg. I « *ghosts* » nucleati (il *pellet* della prima centrifugazione) erano incubati a 0 °C per 10 minuti in 2,5 ml di NP-40 0,1% nello stesso tampone, quindi omogenizzati in *Donce* (pestello B) e centrifugati per 5 minuti a 100 xg per separare il *pellet* (nuclei intatti) dal sovrinatante (plasmamembrane, microsomi e mitocondri intatti). Il sovrinatante era ulteriormente centrifugato per 1 ora a 100,000 xg per separare le plasmamembrane solubilizzate (sovrinatante) dai mitocondri e microsomi (*pellet*).

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Abbiamo precedentemente dimostrato che la Con A (50 μ g/ml) causa sulle cellule HeLa una riduzione dell'inibizione della sintesi proteica indotta dalla abrina e dalla ricina [6]. Lo stesso effetto protettivo si nota anche sulle FLC. La Fig. 1 mostra la riduzione causata dalla Con A dell'inibizione della sintesi proteica indotta dalla ricina (A) e dalla abrina (B). L'effetto protettivo esercitato dalla Con A non è dovuto a competizione sui recettori di membrana e quindi a una riduzione della tossina associata alle cellule, in quanto studi di legame non hanno evidenziato differenze tra le cellule trattate con Con A e le cellule di controllo. Con l'uso di ricina iodinata abbiamo quindi studiato la distribuzione intracellulare della tossina in cellule non trattate e in cellule trattate con Con A. La Fig. 2 mostra il risultato del frazionamento cellulare dopo 1 ora di trattamento con la ricina, nelle due condizioni sperimentali. La tossina presente nel *cytosol* delle cellule trattate con Con A è 2,5 volte inferiore rispetto alle cellule non trattate. Inoltre la tossina trattenuta nelle plasmamembrane delle cellule trattate risulta 4 volte

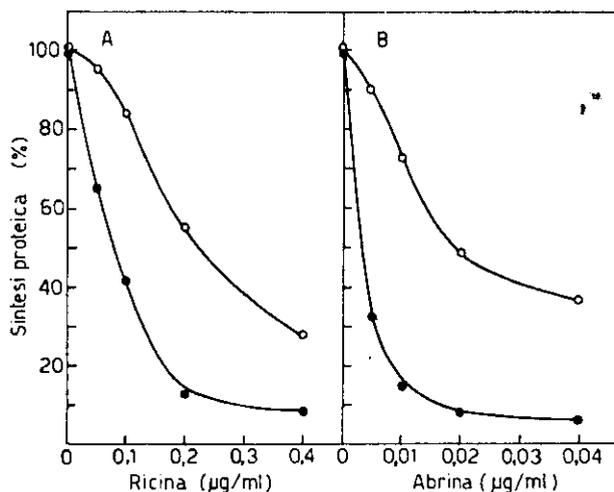


FIG. 1. - Effetto della Con A sulla inibizione della sintesi proteica indotta dalla ricina (A) e dalla abrina (B) su FLC. *Ascissa*: concentrazioni (μ g/ml) di ricina (A) e di abrina (B); *ordinata*: sintesi proteica (%) rispetto ai controlli. La metodica è descritta in « Materiali e Metodi ». ● Cellule non trattate; ○ Cellule trattate con Con A. Ogni punto rappresenta la media di campioni in duplicato

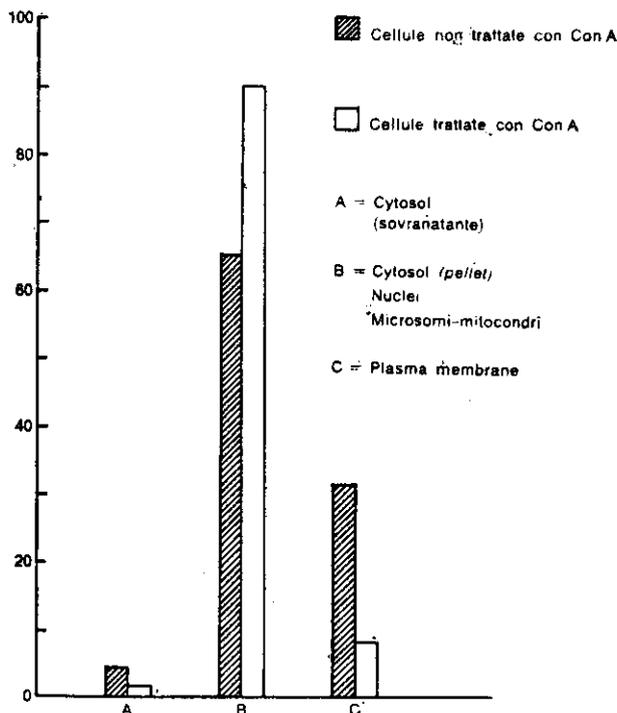


FIG. 2. - Distribuzione di ricina iodinata in frazioni subcellulari di FLC. *Ascissa*: frazioni subcellulari; *ordinata*: percentuale di radioattività totale recuperata. FLC (5×10^6 cell.) erano incubate in 1 ml di MEM con o senza 50 μ g/ml di Con A; dopo 1 ora a 37 °C, le cellule erano lavate due volte e trattate con 0,5 μ g/ml di ricina iodinata per 30 min a 37 °C; dopo tre lavaggi, le cellule erano frazionate come descritto in « Materiali e Metodi »

inferiore rispetto ai controlli. Questi dati dimostrano che nelle cellule trattate con Con A una maggiore quantità di ricina si localizza tra il *cytosol* e la membrana plasmatica. Presumibilmente la tossina è sequestrata in compartimenti subcellulari immediatamente sottostanti la membrana plasmatica (strutture simili alle *coated vesicles*). Questi dati sono confermati anche a livello morfologico con l'uso di ricina fluoresceinata.

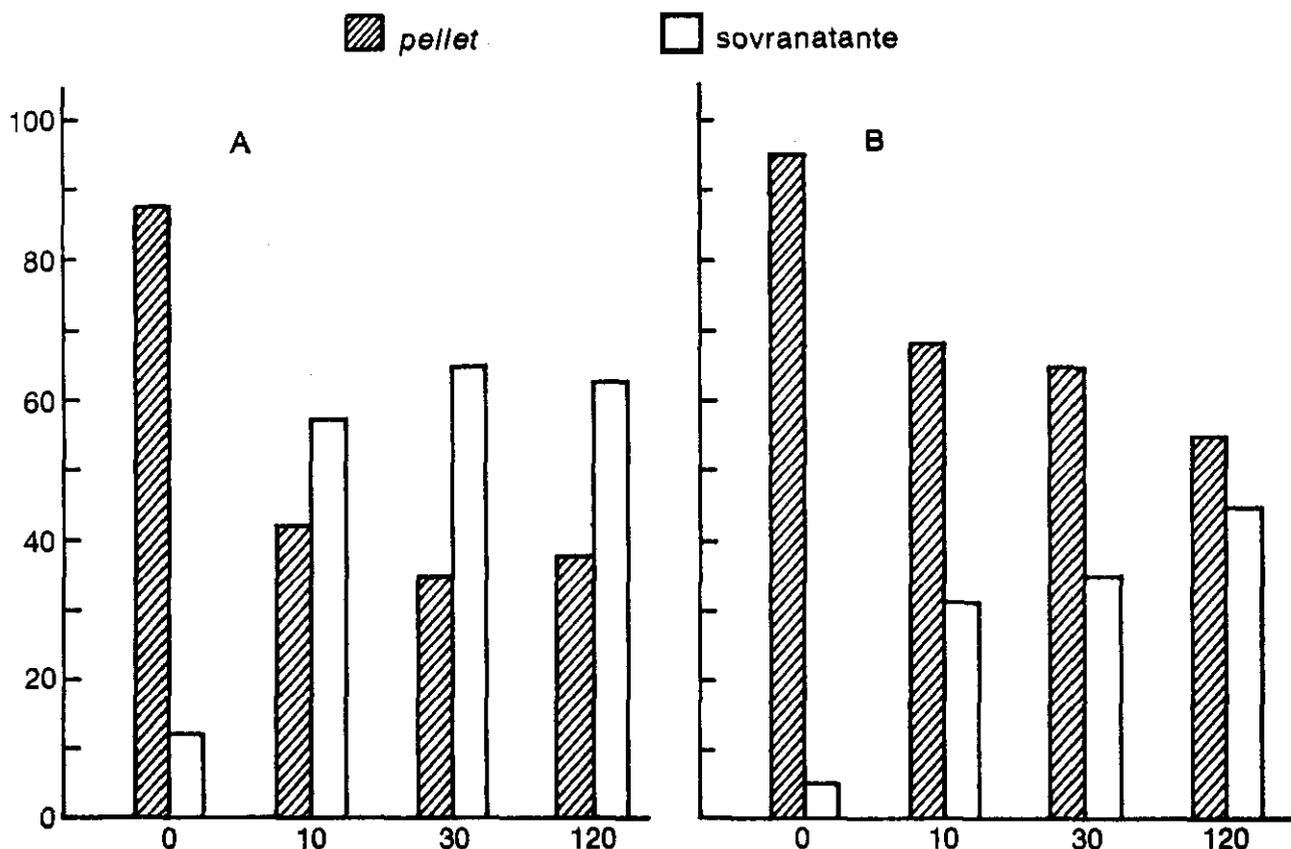


FIG. 3. - Rilascio di ricina iodinata in cellule non trattate (A) e cellule trattate con Con A (B). *Ascissa*: tempo (min); *ordinata*: percentuale di radioattività recuperata. FLC (2×10^6 cell.) erano incubate in 1 ml di MEM con o senza 50 $\mu\text{g/ml}$ di Con A; dopo 1 ora a 37 °C, le cellule erano lavate due volte e incubate con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ di ricina iodinata a 37 °C. Dopo 30 min, le cellule erano lavate quattro volte e risospese in 1 ml di MEM a 37 °C; ai tempi indicati le cellule erano centrifugate e lavate due volte (i lavaggi erano aggiunti al sovrinatante). I dati sono la media di tre esperimenti

Dopo 1 ora di intossicazione, infatti, nelle cellule trattate con Con A si osserva un forte addensamento di tossina alla periferia della cellula, mentre mancano gli *spots* presenti nel citoplasma delle cellule di controllo. Questi nostri dati biochimici e morfologici suggeriscono che la Con A sembra indurre un aumento della quantità totale di tossina associata alle cellule, una riduzione dell'entrata della tossina nel citoplasma e una riduzione di tossina legata alle plasmamembrane.

L'aumentata quantità di ricina e abrina associata alle cellule trattate con Con A potrebbe essere il risultato di un diverso grado di eluizione di tossina dalle cellule, dovuto alle modificazioni della mobilità di membrana indotte dalla Con A. I nostri esperimenti dimostrano, infatti, che la Con A riduce il processo di rilascio della tossina, dopo 1 ora di intossicazione (Fig. 3). Nelle FLC non trattate l'eluizione è molto rapida e dopo 30 minuti raggiunge il *plateau*, mentre nelle cellule trattate con Con A, dopo 30 minuti solo il 50% della tossina radioattiva è rilasciato nel mezzo, rispetto ai controlli. Lo stesso fenomeno, ma più lento, è osservabile nelle cellule HeLa. I nostri risultati sono in accordo con dati bibliografici, i quali dimostrano, su altri sistemi cellulari, che la Con A riduce il rilascio di proteine di membrana [13]. Il trattamento con Con A non sembra influenzare la degradazione della tossina, in quanto circa il 90% della radioattività trovata nel mezzo è TCA-precipitabile. Inoltre la tossina rila-

sciata resta biologicamente attiva in entrambe le condizioni sperimentali.

Ci siamo chiesti se il diverso grado di eluizione possa giocare un ruolo significativo nella inibizione della abrina e della ricina indotta dalla Con A. La Tab. 1 mostra l'effetto del lattosio aggiunto a cellule HeLa dopo 1 ora di intossicazione con la abrina. Il lattosio è stato aggiunto per prevenire l'eventuale nuovo le-

Tabella 1. - Effetto dell'aggiunta di lattosio sulla attività tossica della ricina.

Ricina ($\mu\text{g/ml}$)	PERCENTUALE DI SINTESI PROTEICA			
	Cellule non trattate		Cellule trattate con Con A	
	- lattosio	+ lattosio	- lattosio	+ lattosio
0,005	70	85	80	84
0,01	60	78	70	77
0,02	45	70	68	71

Monostrati confluenti di cellule HeLa erano incubati in MEM con o senza 50 $\mu\text{g/ml}$ di Con A; dopo 1 ora a 37 °C, le cellule venivano lavate e trattate con concentrazioni crescenti di ricina; dopo 1 ora a 37 °C, le cellule erano lavate con o senza lattosio 0,1 M e successivamente incubate con o senza lattosio 1 mM; dopo 2 ore a 37 °C, veniva aggiunta leucina triziata e la sintesi proteica era misurata come descritto in «Materiali e Metodi».

game della tossina rilasciata. L'effetto protettivo esercitato dal lattosio sulle cellule non trattate con Con A è simile all'effetto protettivo indotto dalla Con A.

Questi dati suggeriscono che il ridotto grado di eluizione causato dalla Con A gioca un ruolo importante nella inibizione della tossicità della abrina e della ricina, nel senso che genera una più bassa probabilità di entrata della tossina nelle cellule trattate rispetto ai controlli. Il meccanismo con cui lectine tossiche, come l'abrina e la ricina, possano penetrare nel citoplasma non è ancora stato chiarito. Circa l'internalizzazione di abrina e ricina, è stato visto che non hanno effetti significativi inibitori dei microtubuli e dei microfilamenti (colchicina e cytochalasina B), inibitori γ -glutamyl transpeptidasi (dansylcadaverina e metilammina) ed agenti lisosomotropici (clorochina). I nostri esperimenti confermano che la clorochina non influenza l'attività della abrina e della ricina. Inoltre studi biochimici indicano che, nel processo di internalizzazione della ricina, è da escludere qualsiasi modello che implichi un trasporto

selettivo della catena A separata dalla catena B nel citoplasma [14].

È stato dimostrato [4], attraverso studi autoradiografici, che per uccidere la cellula è sufficiente una singola molecola di abrina o ricina presente nel citoplasma. Appare quindi evidente che, dopo il legame della tossina alla superficie cellulare, la penetrazione nel citoplasma di molecole contenenti la regione A è un evento *random*. In accordo con questa ipotesi, noi pensiamo che il processo di penetrazione della tossina potrebbe essere il risultato di una interazione dinamica tossina-cellula, in cui molecole intatte di tossina si legano, penetrano e vengono rilasciate in un ciclo continuo. L'entrata di abrina o ricina nel citoplasma potrebbe essere una funzione probabilistica del numero di cicli legame-internalizzazione-eluizione della tossina. I nostri risultati suggeriscono che la Con A rallenta il riciclaggio della tossina, riducendo, nelle cellule trattate, la probabilità di entrata della tossina nel citoplasma.

BIBLIOGRAFIA

1. OLSNES, S. & PIHL, A. 1976. *The specificity and action of animal, bacterial and plant toxin. Receptors and recognition*, ser. B. P. Cuatrecasas (Ed.). Chapman and Hall, London, pp. 129-173.
2. SANDVIG, K., OLSNES, S. & PIHL, A. 1978. Binding, Uptake and degradation of the toxic proteins abrin and ricin by toxin-resistant cell variants. *Eur. J. Biochem.* **82**: 13-23.
3. NICOLSON, G. L. 1974. Ultrastructural analysis of toxin binding and entry into mammalian cells. *Nature.* **251**: 628-630.
4. EIKLID, K., OLSNES, S. & PIHL, A. 1980. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **126**: 321-326.
5. TOMASI, M., DELFINI, C., SARGIACOMO, M., OBERHOLTZER, G. & D'AGNOLO, G. 1979. Effect of cholera toxin on ricin activity. *Natural Toxin*. D. Eaker & T. Wdastrom (Eds.). Pergamon Press, pp. 457-462.
6. DELFINI, C., AMICI, C., OBERHOLTZER, G., SARGIACOMO, M. & TOMASI, M. 1981. Lectins inhibition of ricin and abrin toxic activities. *Abstracts of 4th European symposium on animal, plant and microbial*. International society on toxicology, Marseille, France, p. 31.
7. YAHARA, I. & EDELMAN, G. M. 1975. Modulation of lymphocyte receptor mobility by locally bound concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **72**: 1579-1583.
8. SCHLESSINGER, J., ELSON, E. L., WEBB, W. W., YAHARA, I., RUTISHAUSER, U. & EDELMAN, G. M. 1977. Receptor diffusion on cell surfaces modulated by locally bound concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **74**: 1110-1114.
9. SCHLESSINGER, J., KOPPEL, D. E., AXELROD, D., JACOBSON, K., WEBB, W. W. & ELSON, E. L. 1976. Lateral transport on cell membranes: mobility of concanavalin A receptors on myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **73**: 2409-2413.
10. EDELSON, P. L. & COHN, Z. A. 1974. Effects of concanavalin A on mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **140**: 1364-1386.
11. NICOLSON, G. L. & BLAUSTEIN, J. 1972. The interaction of ricinus communis agglutinin with normal and tumor cell surfaces. *Biochem. Biophys. Acta.* **266**: 543-547.
12. GAZITT, Y. & FRIEND, C. 1981. Synthesis and phosphorylation of plasma membrane proteins Friend. *Cancer Res.* **41**: 1064-1068.
13. DOETSCHMAN, T. C. 1980. The effects of Con A on cell surface shedding in cell cultures. *J. Cell Sci.* **46**: 221-234.
14. RAY, B. & WU, H. C. 1981. Internalization of ricin in chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.* **1**: 544-551.

Etiologia infettiva batterica negli anni 1979 e 1980

M. ENRICA SALVETTI (a) e MASSIMO MORETTI (b)

(a) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma;

(b) Cattedra di Statistica Sanitaria, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - Sono riportate le frequenze di isolamento, nel periodo 1979-80, di 2.762 ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi identificati da un totale di 29 diversi tipi di materiali patologici. Tali frequenze sono state esaminate prendendo in considerazione le diverse corsie e reparti ospedalieri.

Summary (Isolation of Bacteria from Pathological Specimens in the Institute of Microbiology of Rome University: a Survey of the Years 1979-80). - Isolation frequencies of 2.762 Gram-positive and Gram-negative aerobic bacterial strains isolated in 1979 and 1980 are reported. They were collected and identified from a total of 29 different kinds of pathological specimens coming from 24 different clinical wards. The isolation frequencies of specific pathogenic specimen (particularly from urinary and respiratory tract infections), have been compared with regard to the distinct clinical wards and the different periods of the year.

Senza dubbio l'epidemiologia attuale presenta caratteri di multidisciplinarietà scientifica e tecnico-organizzativa. In particolare l'epidemiologia batterica oggi va intesa, oltre che come etiologia e ricorrenza di infezioni, come frequenza di determinati ceppi recanti determinate resistenze. Lo studio di essa mira anche a dare una risposta agli aspetti della frequenza delle malattie infettive, in particolare alle infezioni nosocomiali, alle loro cause, alla loro diffusione, alla efficacia delle misure da adottare sotto il profilo sia della prevenzione, sia della terapia. Questo breve intervento si limita al primo capitolo della epidemiologia infettiva, precisamente alla etiologia; esso ha per oggetto i dati microbiologici e clinici relativi alle frequenze di 2.762 ceppi aerobi isolati, durante il 1979 e il 1980, nell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma, da 29 diversi tipi di materiale patologico, provenienti da 24 Istituti clinici, oltre che da pazienti ambulatoriali. I dati, opportunamente codificati, sono stati oggetto di una analisi descrittiva tramite programmi in FORTRAN e con l'uso dello Statistical Package for the Social Sciences.

Il primo istogramma illustra le percentuali di isolamento dei 2.762 ceppi isolati nel biennio 1979-80, suddivisi in Gram-positivi e Gram-negativi, e riporta, a titolo comparativo, anche i dati dei 6 precedenti anni [1] per un totale di 9.665 ceppi (Fig. 1). Premesso che non sempre è possibile attribuire significato di etio-

patogenicità infettiva ai ceppi isolati, da tale figura si rileva che negli ultimi 2 anni l'etiologia batterica è stata sostenuta, per lo più, da ceppi Gram-positivi. Questi, nel 1979, hanno registrato una frequenza (55,7%) pressoché identica a quella del 1973, ma superiore a quella dei 5 anni intermedi, frequenza che è poi leggermente scesa nel 1980 (54,5%). Variazioni negli ultimi 2 anni hanno registrato anche le percentuali di isolamento delle singole specie batteriche (Fig. 2). Va però precisato che nel 1979 vennero codificati come Stafilococchi quelli morfologicamente tali ed MSA-positivi (gli MSA-negativi sono stati associati ai micrococchi), mentre nel 1980 sono stati associati a questi anche gli stafilococchi i cui rispettivi materiali patologici non erano stati seminati su MSA. Pertanto, la netta diminuzione nella percentuale di isolamento degli stafilococchi rilevabile nel 1980, è in realtà molto più bassa di quanto numericamente non appare. Infatti, se sommiamo le frequenze di isolamento degli stafilococchi e dei micrococchi del 1979 e le confrontiamo con quelle del 1980, ci accorgiamo che la differenza è ridotta soltanto a 1,7%. Analoga riduzione nel 1980 si è avuta da parte dei ceppi di *Escherichia coli* e di *Proteus* (rispettivamente dal 18,3 al 17,3% e dal 12,2 all'11,6%) mentre, rispetto al 1979, sono leggermente aumentate le frequenze di isolamento dei ceppi di *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* (dall'8,2 allo 8,9%; dal 7,4 all'8,3%; dal 4,7 al 5,4%).

Ma confrontando globalmente i dati del biennio 1979/1980 con quelli dei 6 precedenti anni, rileviamo

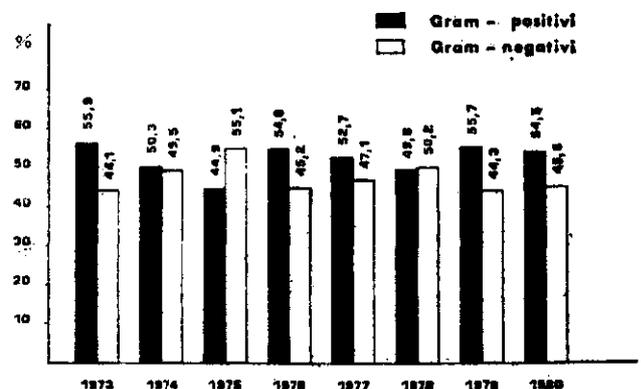


FIG. 1. - Frequenze di isolamento di 9.665 ceppi Gram-positivi e Gram-negativi negli anni 1973-1980

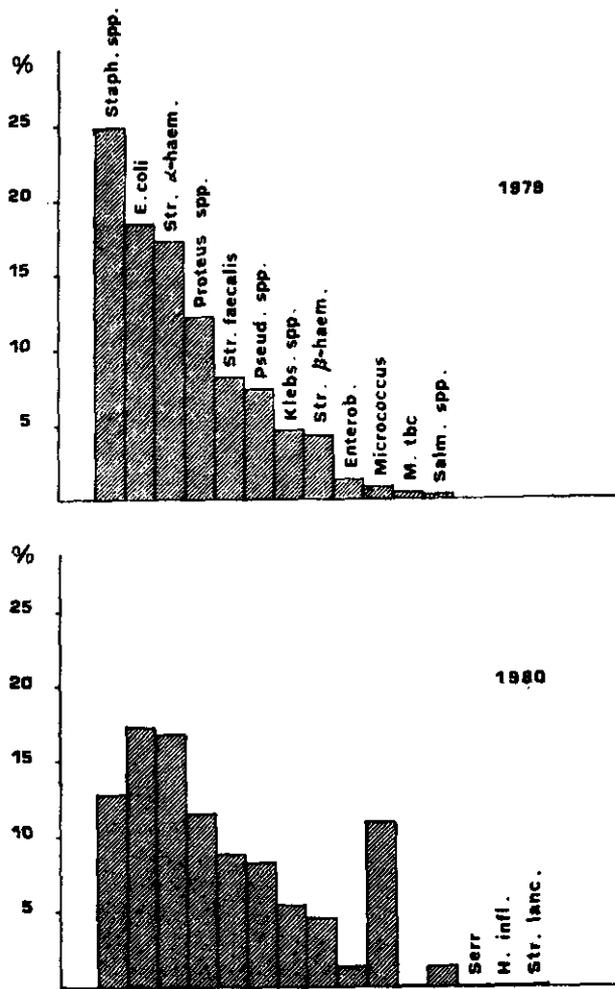


FIG. 2. - Frequenze delle singole specie batteriche in 2.762 ceppi isolati nel 1979 e 1980 (posto = 100 il totale dei ceppi isolati nei singoli anni)

che, nel complesso, l'etiologia da Staphylococcus è divenuta più frequente, così come quella da Streptococcus faecalis. È invece leggermente diminuita quella da Streptococcus alpha-haemoliticus e da Pseudomonas, mentre l'etiologia da Streptococcus beta-haemoliticus, Escherichia coli, Klebsiella e Proteus (con costante, netta prevalenza della specie mirabilis) non ha subito sostanziali variazioni. Per quanto concerne il rapporto Streptococchi alfa/beta emolitici, esso si è mantenuto costante, pari all'incirca a 4 : 1, anche se con una certa tendenza a ridursi. Ma è noto che le frequenze di isolamento delle singole specie batteriche variano anche con i singoli materiali patologici e quindi con i vari distretti ed organi.

Soffermandoci sui distretti respiratorio e urinario (quelli cioè da cui proviene il maggior numero di ceppi), è interessante rilevare quanto diversamente incidono i ceppi Gram-positivi e quelli Gram-negativi nel determinarne la rispettiva etiologia infettiva, ricavando questa dalle frequenze di isolamento dei ceppi da campioni, rispettivamente, di espettorato e di urina (Fig. 3). Infatti, in entrambi gli anni in esame, nell'apparato urinario essa fu sostenuta essenzialmente da ceppi Gram-negativi: il rapporto Gram-positivi/Gram-negativi fu all'incirca di 1 a 2, così come nei precedenti 3 anni era stato di 1 a 3. Invece, nell'apparato

respiratorio, sempre nel biennio 1979-80, il rapporto è risultato pari a 5 a 1 (in precedenza era stato 3 a 1).

Da rilevare che nei broncoaspirati, pur con le riserve legate allo scarso numero (23) dei ceppi isolati, il rapporto Gram-positivi/Gram-negativi è risultato 1 a 1, perciò assai diverso da quello rilevato negli espettorati, e ciò per una maggiore presenza di ceppi Gram-negativi.

Per quanto concerne le singole specie batteriche, nell'etiologia dell'apparato urinario, dal 1979 al 1980, pur rimanendo costante la netta minoranza dei ceppi Gram-positivi, è aumentata l'etiologia sostenuta da ceppi di Streptococcus faecalis, oltre che di Klebsiella, mentre si è ridotta quella da Escherichia coli. Nell'apparato respiratorio, invece, si è registrata una netta diminuzione dei ceppi di Streptococcus faecalis e beta-haemoliticus con relativo aumento dei ceppi Gram-negativi, in particolare di Escherichia coli ma, soprattutto, di Pseudomonas.

Nel complesso, nel biennio 1979-80, l'etiologia infettiva batterica è stata sostenuta per lo più: da ceppi Gram-positivi nelle vie respiratorie, nelle raccolte ascessuate, nell'apparato osteo-articolare e nelle ferite parietali; da ceppi Gram-negativi nella cavità peritoneale, nelle vie urinarie, nelle vie biliari, nella cavità pleurica, (Fig. 4).

Abbiamo poi voluto indagare, come già per i precedenti anni, sulle frequenze di isolamento dei vari ceppi in rapporto alla diversa provenienza clinica dei rispettivi materiali patologici, dividendo i malati in 4 gruppi: pazienti ambulatoriali, degenti in Istituti me-

ETIOLOGIA INFETTIVA DELL' APPARATO RESPIRATORIO E DELLE VIE URINARIE			
	PERIODO	APPARATO URINARIO	APPARATO RESPIRATORIO
	1976/78	1 / 3	3 / 1
RAPPORTO FREQUENZE ISOLAMENTO CEPPI GRAM + / GRAM -	1979/80	1 / 2	5 / 1

FIG. 3

ETIOLOGIA INFETTIVA SOSTENUTA NEI DIVERSI DISTRETTI DA CEPPI GRAM-POSITIVI E DA CEPPI GRAM-NEGATIVI

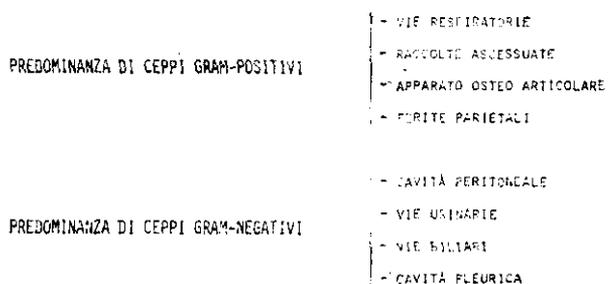


FIG. 4

dici, degenti in Istituti chirurgici, degenti in Istituti pediatrici (Fig. 5). Dalla nostra indagine è emerso che, negli ultimi 2 anni, nei pazienti ambulatoriali l'etiologia batterica è stata sostenuta essenzialmente da ceppi Gram-positivi. Essa è risultata praticamente invariata rispetto agli anni precedenti: il rapporto Gram-positivi/Gram-negativi si è mantenuto all'incirca su 3 a 1.

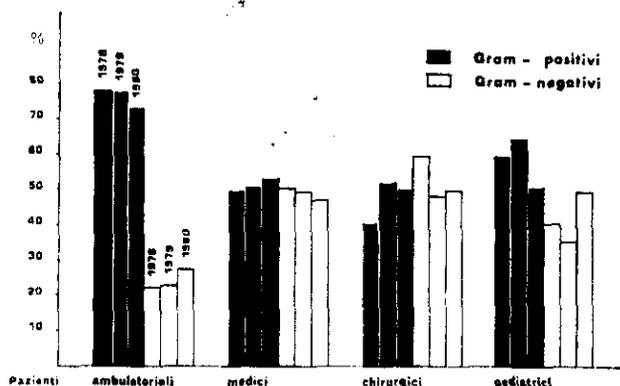


FIG. 5. - Etiologia infettiva sostenuta da 4.252 ceppi, Gram-positivi e Gram-negativi di diversa provenienza clinica, negli anni 1978, 1979, 1980

Nei degenti in Istituti medici, invece, in cui in precedenza tale rapporto era stato di 1 a 1, nel 1979 e nel 1980 si è avuta una tendenza ad un lieve aumento dei Gram-positivi. L'aumento di tali ceppi è risultato assai netto nei pazienti chirurgici: nel 1980 l'etiologia batterica (in precedenza sostenuta essenzialmente da Gram-negativi) lo fu in pari percentuale da Gram-positivi e da Gram-negativi. A tale rapporto (1 a 1) sono giunti, sempre nel 1980, anche i ceppi isolati dai piccoli pazienti, ma ciò per un processo inverso al precedente, cioè per una netta diminuzione dei ceppi Gram-positivi.

Passando ad analizzare le frequenze di isolamento delle singole specie nei 4 gruppi di malati, dal successivo istogramma, relativo al 1980, si rileva che dette frequenze furono tutt'altro che uniformi (Fig. 6). Infatti, nei pazienti ambulatoriali l'etiologia batterica fu sostenuta per lo più da stafilococchi, da streptococchi alfa-emolitici e da ceppi di *Escherichia coli*; nei degenti in Istituti medici lo fu, oltre che da ceppi di streptococchi alfa-emolitici e di *Escherichia coli*, da ceppi di *Proteus*; nei degenti in Istituti chirurgici l'etiologia infettiva fu invece dominata da ceppi di *Escherichia coli*, da stafilococchi e caratterizzata da un'alta incidenza di

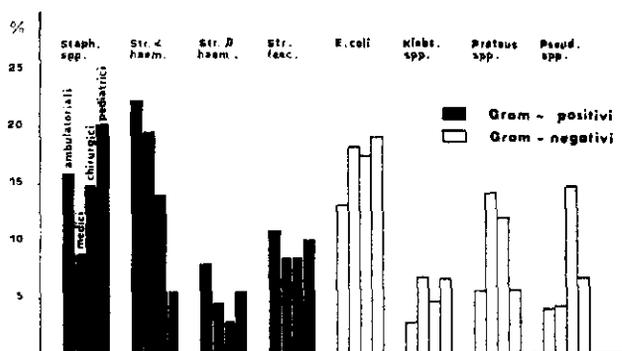


FIG. 6. - Frequenze di alcune specie batteriche, in rapporto alla diversa provenienza clinica in 1.252 ceppi batterici isolati nel 1980

Pseudomonas e *Proteus* mentre, nei piccoli degenti, fu determinante la frequenza dei ceppi di stafilococchi e di *Escherichia coli*.

Infine, anche per quanto concerne la distribuzione attraverso l'anno delle diverse percentuali di isolamento dei singoli ceppi, l'elaborazione dei dati ha fornito elementi non privi di interesse. Prendendo ad esempio le frequenze di isolamento dei ceppi di *Pseudomonas* e di *Streptococcus faecalis* (ceppi particolarmente interessanti per la loro patogenicità), nel 1979 l'etiologia infettiva da *Pseudomonas* risultò la più frequente: nel I quadrimestre nei piccoli degenti; nel III nei degenti in Istituti medici e in quelli chirurgici. Nel 1980, invece, essa predominò, in tutti e 3 i gruppi di pazienti, durante il I quadrimestre. Per quanto riguarda i ceppi di *Streptococcus faecalis*, in entrambi gli anni essa risultò la più frequente: nel I quadrimestre nei degenti in Istituti medici, nel III nei pazienti ambulatoriali e nei degenti chirurgici. I dati relativi ai piccoli pazienti sono scarsi e quindi statisticamente non significativi. Pertanto, in tutti i pazienti, i ceppi di *Pseudomonas* e di *Streptococcus faecalis* nei mesi estivi hanno inciso in minor misura nell'etiologia batterica rispetto agli altri periodi dell'anno.

Per concludere, dopo aver fatta mia la bella immagine di O'Brien, che vede il laboratorio batteriologico ospedaliero come un gigantesco sismografo teso ad evidenziare nuovi eventi etiologici, oltre quelli genetici ed epidemiologici che si verificano nella diffusione delle infezioni nosocomiali e della antibiotico-resistenza, io vorrei aggiungere che esso avrà, sotto il profilo clinico, maggiore significato e validità se affiancato da un computer nell'ambito di un « Servizio » per la elaborazione dei dati.

BIBLIOGRAFIA

1. SALVETTI, M. E. 1980. Etiologia infettiva batterica e frequenze di antibiotico-sensibilità negli anni 1973-1978. (Elaborazione dei dati relativi a 6.903 ceppi). Il Pensiero Scientifico (Ed.). Roma. 54: 121-132.

Studio sull'attività antibatterica dell'acido pipemidico

ANTONELLA TOROSANTUCCI, LAURA CIALDEA, ANNA MARIA CALABRÒ e GIULIANA FILLINI

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - È stato effettuato uno studio sull'attività esercitata dall'acido pipemidico verso ceppi batterici di fresco isolamento da materiale biologico appartenenti ai generi *Proteus* (*vulgaris*, *morganii*, *mirabilis*, *rettgeri*) e *Klebsiella* ed alle specie *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*, rilevando la significativa attività esercitata da questo agente antimicrobico.

L'attività dell'acido pipemidico, comparata con quella dell'acido nalidixico e dell'acido piromidico, risulta in genere significativamente superiore. Tali risultati indicano la effettiva efficacia terapeutica di questo agente antimicrobico nelle infezioni del tratto urinario sostenute da batteri Gram-negativi.

Summary (Antibacterial Activity of Pipemidic Acid). - A study has been carried out on the activity of the pipemidic acid against bacterial strains of recent isolation from biologic materials: strains of the genus *Proteus* (*vulgaris*, *morganii*, *mirabilis*, *rettgeri*) and *Klebsiella* and of the species *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The results pointed out that a significant antibacterial activity is exerted by this antimicrobial agent. The activity of the pipemidic acid, as compared with that of nalidixic acid and the piromidic acid, usually was significantly superior. These results point out the real therapeutic efficacy of this antimicrobial agent in the infections of the urinary tract caused by Gram-negative bacteria.

INTRODUZIONE.

L'acido pipemidico [acido 8-etil-5-osso-2-(1-piperazinil)-5, 8-diidro-pirido-(2, 3-d)-pirimidin-6-carbossilico] sintetizzato da Pesson e Coll. nel 1974 [1], è una sostanza strutturalmente correlata e con proprietà chemioterapiche simili a quelle degli acidi nalidixico e piromidico, ma con spettro di attività più ampio, in particolare verso *Pseudomonas aeruginosa* [2].

L'acido pipemidico ha trovato applicazione clinica nel trattamento delle infezioni dell'apparato urinario, dell'intestino, delle vie biliari, ottenendo risultati significativi anche in quei pazienti che avevano ricevuto trattamento protratto con altri chemioterapici ed antibiotici [2].

Generalmente, verso le specie Gram-negative sensibili, l'acido pipemidico esercita un'attività antibatterica superiore a quella degli acidi nalidixico e piromidico, sia *in vitro* che *in vivo* con livelli ematici ed urinari più

elevati, migliore distribuzione in organi e tessuti e con resistenza crociata incompleta verso l'acido nalidixico e l'acido piromidico [3]. I livelli urinari dell'acido pipemidico risultano elevati e persistenti: infatti, dopo 2-4 h dalla somministrazione di una dose di 0,5 g tali livelli superano nell'uomo 1.000 µg/ml e persistono lungamente con valori significativi; la somministrazione di una dose unica di 1 g determina livelli superiori a 100 µg/ml nelle 12-24 h successive.

Altra interessante caratteristica di questo agente antimicrobico è quella di inibire il trasferimento per coniugazione dei plasmidi R, vettori dell'informazione genetica per l'antibiotico-resistenza, con frequenza maggiore rispetto a quella degli acidi nalidixico e piromidico, grazie alla sua più elevata attività antibatterica [4].

In questo lavoro vengono riportati i risultati di uno studio *in vitro* sull'attività antibatterica dell'acido pipemidico verso numerosi ceppi batterici di fresco isolamento da materiale biologico proveniente da vari reparti clinici del Policlinico Umberto I di Roma. L'attività è stata studiata in varie condizioni sperimentali (in rapporto al pH del mezzo colturale, alla presenza di siero e all'entità dell'inoculo batterico); in alcune prove l'attività dell'acido pipemidico è stata comparata con quella esercitata, nelle stesse condizioni sperimentali, dall'acido nalidixico e dall'acido piromidico.

MATERIALI E METODI.

Le prove di attività antibatterica sono state effettuate con 75 ceppi di *P. aeruginosa*, 83 ceppi di *Proteus mirabilis*, 25 ceppi di *Proteus vulgaris*, 38 ceppi di *Proteus morganii*, 23 ceppi di *Proteus rettgeri*, 40 ceppi di *Escherichia coli* e 35 ceppi del genere *Klebsiella*. L'inoculo veniva ottenuto per diluizione di brodocolture di 18 h di sviluppo a 37 °C in Muller Hinton Broth (B.B.L. U.S.A.) e insemato nei mezzi di prova alla densità finale di 2·10⁵ batteri/ml; in alcune prove l'inoculo era di 2·10³ batteri/ml o 2·10⁶ batteri/ml. Gli agenti antimicrobici (acido pipemidico, acido nalidixico e acido piromidico) venivano disciolti alla concentrazione di 15 mg/ml in H₂O mediante aggiunta di NaOH 0,1 N, allestendo soluzioni madri che venivano poi opportunamente diluite nei mezzi di prova (Muller Hinton Broth o DST agar). La lettura dei risultati, eseguita dopo incubazione di 18 h a 37 °C ha per-

Tabella 1. - Azione dell'acido pipemidico su 169 ceppi del genere *Proteus* (83 ceppi di *P. mirabilis*, 25 ceppi di *P. vulgaris*, 38 ceppi di *P. morganii*, 23 ceppi di *P. rettgeri*).

M. I. C. ($\mu\text{g/ml}$)	<i>P. mirabilis</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>P. morganii</i>		<i>P. rettgeri</i>		TOTALE*
	N. ceppi	%	N. ceppi	%	N. ceppi	%	N. ceppi	%	
0,80	17	—	6	—	20	—	5	—	48
1,56	17+19	—	6+15	—	20+11	—	5+7	—	48+52
3,12	36+29	—	21+3	96	31+3	89	12+1	—	100+36
6,25	65+9	89	24+1	—	34+4	—	13+3	69	136+17
12,50	74+4	—	—	—	—	—	16+1	—	153+5
[25,00	78+3	98	—	—	—	—	17+2	—	158+5
50,00	81+2	—	—	—	—	—	19+1	87	163+3
100,00	—	—	—	—	—	—	20+3	—	166+3
	x = 4,99		x = 1,75		x = 1,77		x = 19,53		

Esperimenti effettuati in Muller-Hinton Broth. Inoculo di $2 \cdot 10^5$ cellule/ml. Lettura dopo incubazione di 18 h a 37° C.

messo di conoscere le concentrazioni minime inibenti (M.I.C.) dei chemioterapici espresse in $\mu\text{g/ml}$, cioè le concentrazioni capaci di inibire lo sviluppo dei batteri insemnati.

RISULTATI.

Attività dell'acido pipemidico verso il genere Proteus. - L'acido pipemidico esercita una potente azione antibatterica verso le varie specie del genere *Proteus*, come si riscontra dai dati riportati nella Tab. 1; infatti, entro la concentrazione di 6,25 $\mu\text{g/ml}$ vengono inibiti nello sviluppo l'89% dei ceppi di *P. mirabilis* saggiati ed il 100% dei ceppi di *P. vulgaris* e di *P. morganii*. Anche verso i ceppi di *P. rettgeri* (di cui è nota la scarsa sensibilità verso vari agenti antimicrobici) l'attività è notevole: alla stessa concentrazione risulta sensibile

Tabella 2. - Influenza del pH del mezzo colturale sull'attività antibatterica dell'acido pipemidico verso 75 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*.

M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$)	pH 5,8		pH 7,2	
	N. ceppi	%	N. ceppi	%
0,76	1	—	1	—
1,56	—	—	11+1	—
3,12	4+1	—	31+12	—
6,25	36+5	54	10+43	70
12,50	9+41	—	9+53	—
25,00	9+50	78	6+62	90
50,00	4+59	—	—	—
100,00	4+63	—	4+68	—
200,00	7+67	—	2+72	—
400,00	1+74	—	1+74	—
x =	39,68	—	21,86	—

Esperimento effettuato in Mueller-Hinton broth con un inoculo di $2 \cdot 10^6$ cellule/ml. Lettura effettuata dopo incubazione delle colture per 18 h a 37° C.

il 69% dei ceppi saggiati e non si riscontrano ceppi resistenti a concentrazioni superiori a 100 $\mu\text{g/ml}$. I risultati dell'attività dell'acido pipemidico in rapporto al pH del mezzo colturale e alla presenza di siero di cavallo dimostrano che la sensibilità dei ceppi non risulta sostanzialmente modificata.

Attività dell'acido pipemidico verso Pseudomonas aeruginosa. - Ceppi di fresco isolamento di *P. aeruginosa* mostrano buona sensibilità verso l'acido pipemidico. Infatti, come si può rilevare nella Tab. 2, sia a pH 5,8 che a pH 7,2, entro la concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$ vengono inibiti nello sviluppo rispettivamente il 78% ed il 90% dei 75 ceppi saggiati; l'azione dell'acido pipemidico è comunque completa entro la concentrazione di 400 $\mu\text{g/ml}$. Anche in questo caso l'aggiunta di siero al mezzo colturale non modifica sensibilmente l'azione antimicrobica del chemioterapico (Tab. 3).

Attività dell'acido pipemidico verso il genere Klebsiella e verso E. coli. - Anche nei confronti di *E. coli* e di *Klebsiella* l'azione antimicrobica dell'acido pipemidico è elevata e si svolge a concentrazioni relativamente basse. Tale attività è scarsamente influenzata dalla variazione del pH e dalla aggiunta di siero di sangue.

Influenza dell'inoculo sull'attività antibatterica dell'acido pipemidico. - I risultati relativi all'attività dell'acido pipemidico in funzione dell'inoculo batterico verso *E. coli* e verso *Klebsiella* rivelano che l'aumento dell'inoculo da $2 \cdot 10^3$ cellule/ml a $2 \cdot 10^5$ cellule/ml influenza scarsamente l'attività dell'agente antimicrobico. Una relativa diminuzione di attività verso la specie *E. coli* si evidenzia invece con una carica batterica di $2 \cdot 10^6$ cellule/ml.

Attività antibatterica dell'acido pipemidico comparata con quella degli acidi piromidico e nalidixico. - Nella Tab. 4 vengono riportati i risultati di prove in cui l'attività dell'acido pipemidico viene paragonata a quella esercitata, nelle stesse condizioni sperimentali, dagli acidi piromidico e nalidixico verso il genere *Proteus*. L'attività esercitata dall'acido pipemidico risulta significativamente superiore sia a quella svolta dall'acido nalidixico che, più marcatamente, a quella svolta dall'acido piromidico.

Tabella 3. - *Influenza del siero sull'attività antibatterica esercitata dall'acido pipemidico verso 22 ceppi di Pseudomonas aeruginosa.*

M. I. C. ($\mu\text{g/ml}$)	Acido pipemidico				Acido pipemidico + siero al 40 %			
	pH 5,8	%	pH 7,2	%	pH 5,8	%	pH 7,2	%
0,39	1	—	—	—	—	—	—	—
1,56	—	—	1	—	—	—	1	—
3,12	—	—	7+1	—	9	—	1+12	—
6,25	1+9	—	5+8	—	5+9	—	—	—
12,50	4+10	—	1+13	—	1+14	—	—	—
25,00	3+14	77	3+14	77	1+15	73	2+13	67
50,00	5+17	—	—	—	2+16	—	4+15	—
100,00	—	—	1+17	—	2+18	—	1+19	—
200,00	—	—	2+18	—	2+20	—	2+20	—
200,00	—	—	2+20	—	—	—	—	—
	x = 19,62		x = 65,55		x = 35,85		x = 35,86	

Esperimento effettuato in Mueller-Hinton broth (B.B.L.) con un inoculo di $2 \cdot 10^8$ cellule/ml. Lettura effettuata dopo incubazione delle colture per 18 h a 37°C.

Tabella 4. - *Attività antibatterica dell'acido pipemidico paragonata all'attività dell'acido piromidico e nalidixico verso 116 di Proteus (65 ceppi di P. mirabilis, 14 ceppi di P. vulgaris, 24 ceppi di P. morgani, 13 ceppi di P. rettgeri).*

M. I. C. ($\mu\text{g/ml}$)	Acido pipemidico		Acido piromidico		Acido nalidixico	
	N. ceppi	%	N. ceppi	%	N. ceppi	%
0,80	47	—	1	—	6	—
1,56	47+26	—	—	—	6+13	—
3,12	73+24	—	1+3	—	19+31	—
6,25	97+8	—	4+6	—	50+31	—
12,50	105+5	—	10+26	—	81+18	—
25,00	110+5	99	36+34	60	99+3	87
50,00	115+1	—	70+21	—	102+6	—
100,00	—	—	91+8	—	108+2	—
200,00	—	—	99+7	—	110+1	—
400,00	—	—	106+1	—	111+1	—
800,00	—	—	107+1	—	—	—
> 800,00	—	—	108+8	—	112+4	—
	x = 3,79		x = 159,1		x = 69,96	

Esperimenti effettuati in Mueller-Hinton Broth. Inoculo di $2 \cdot 10^8$ cellule/ml. Letture dopo incubazione di 18 h a 37°C.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

È noto che nei batteri Gram-negativi responsabili delle infezioni intestinali e delle vie urinarie, il determinarsi del fenomeno resistenza verso gli agenti antibatterici è soprattutto legato a fattori extracromosomiali. Per ciò che riguarda l'acido pipemidico, è interessante rilevare che il trasferimento di resistenza interbatterica mediante plasmidi R non è stato finora ri-

scontrato. Infatti, nel suo meccanismo d'azione, l'acido pipemidico inibendo la sintesi del DNA batterico, blocca il trasferimento dei plasmidi R.

I risultati riportati in questo lavoro dimostrano che l'acido pipemidico si rivela efficace verso ceppi di fresco isolamento clinico (*Proteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella*). Nell'ambito del genere *Proteus* l'attività dell'acido pipemidico si esplica notevolmente verso *P. vulgaris* e *P. morgani*, ma anche *P. rettgeri* risulta sensi-

bile ad esso: tale fatto è di peculiare importanza considerando che questa specie di *Proteus* risulta in genere resistente a vari chemioantibiotici. In generale l'attività dell'acido pipemidico verso i generi *Proteus* e *Klebsiella* e verso *E. coli* risulta in ogni caso significativamente superiore a quella esercitata dagli acidi nalidixico e piromidico. È notevole anche l'attività esercitata verso

P. aeruginosa, in genere scarsamente sensibile all'acido nalidixico e all'acido piromidico. I valori delle concentrazioni inibenti dell'acido pipemidico, posti in relazione con le notevoli e persistenti concentrazioni raggiunte nel distretto d'azione, indicano l'efficacia di questo antimicrobico nelle infezioni del tratto urinario sostenute da germi dei generi *Proteus* e *Pseudomonas*.

BIBLIOGRAFIA

1. PESSON, M., DE LAJUDIE, P., ANTOINE, M., CHABASSIER, S., RICHER, D. & GIRARD, P. 1974. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **278**: 1169-1172.
2. ORPIANESI, C., VITALI, C. & NUARA, C. 1975. *Il Farmaco.* Ed. Pt. **31** (1): 35-39.
3. SHIMIZU, M., TAKASE, Y., NAKAMURA, S., KATAE, H., MINAMI, A., NAKATA, K., INOUE, S., ISHIYAMA, M. & KUBO, Y. 1975. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8** (2): 132-137.
4. NAKAMURA, S., INOUE, S., SHIMIZU, M., IYOBE, S. & MITSUHASHI, S. 1976. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10** (5): 779-784.

Importanza della presenza dei metalli nell'attività antibatterica dell'ovotransferrina

PIERA VALENTI, PAOLO VISCA, CHRISTINA VON HUNOLSTEIN, GIOVANNI ANTONINI,
CARLA CREO e NICOLA ORSI

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - È stata studiata l'attività antibatterica verso *E. coli* di preparazioni di ovotransferrina saturata con differenti ioni metallici (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Contrariamente alla saturazione con Fe^{3+} che annulla completamente l'attività dell'ovotransferrina, è stato osservato che la saturazione con altri metalli può addirittura potenziarne l'attività antibatterica.

Summary (Role of Metals in the Antibacterial Activity of Ovotransferrin). - The antibacterial activity of some preparations of ovotransferrin saturated with different metal ions like Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , has been tested towards *E. coli*. It has been shown that when both sites of ovotransferrin are saturated with iron, no antibacterial activity is present. On the other hand, this latter may be enhanced by saturation with other metal ions.

INTRODUZIONE.

Nei liquidi biologici sono presenti particolari glicoproteine quali la lattoferrina e la sierotransferrina in grado di complessare due atomi di ferro per molecola e di svolgere un importante ruolo nella difesa contro le infezioni microbiche [1].

Infatti i batteri in presenza di transferrina sintetizzano dei composti, siderofori [2], che competono con la proteina stessa. Dall'affinità per il ferro della transferrina e del sideroforo dipende l'invasività batterica. Infatti, se il ferro resta stabilmente legato alla proteina, il batterio non si può moltiplicare. Se, al contrario, il sideroforo riesce a sottrarglielo, il batterio ha ferro sufficiente per svilupparsi. Le nostre sperimentazioni sono state condotte usando ovotransferrina (conalbumina), una transferrina estratta dal bianco dell'uovo. È stata studiata l'attività antibatterica, nei confronti di *E. coli* W1485, di tale proteina saturata con ioni Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} che formano con essa complessi stabili [3].

MATERIALI E METODI.

Ceppo batterico. - Tutti gli esperimenti sono stati condotti usando il ceppo di *E. coli* W1485.

Ovotransferrina. - Preparazioni pure di ovotransferrina furono ottenute come descritto in precedenti ricerche [4].

Ovotransferrina saturata con differenti ioni metallici. - Preparazioni di ovotransferrina disciolte in $NaHCO_3$ 50 mM, erano addizionate di ioni metallici per ottenere una saturazione dei siti al 50% e al 100%. Dopo dialisi contro $NaHCO_3$ 50 mM, l'ovotransferrina saturata veniva liofilizzata e successivamente saggiata per l'attività antibatterica.

Terreno di coltura. - Per lo sviluppo di *E. coli* è stato usato BHI (Brain Heart Infusion) (BBL) contenente $14\mu M$ di ioni Fe^{2+} . Analisi dei metalli erano eseguite utilizzando uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (Perkin-Elmer mod. 360).

Attività antibatterica. - Gli esperimenti sono stati condotti sciogliendo in BHI l'ovotransferrina non saturata o saturata in presenza di $NaHCO_3$ 50 mM. L'inoculo consisteva in $5 \cdot 10^8$ cell/ml che avevano subito tre lavaggi in soluzione fisiologica. La crescita batterica era seguita per 14-20 ore a $37^\circ C$ in un multibiofotometro Abbott MS2. Opportuni controlli erano eseguiti al fine di calcolare le cellule vitali mediante la conta delle unità formanti colonia.

RISULTATI.

Una serie di esperimenti è stata condotta al fine di confrontare l'attività antibatterica dell'ovotransferrina non saturata con quella saturata con Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} al 50% e al 100%. In queste prove, ovviamente, i controlli erano rappresentati dalla crescita di *E. coli* in BHI addizionato dei vari metalli, alla concentrazione necessaria per saturare la transferrina al 100%. I dati ottenuti dimostrano che, almeno a queste concentrazioni, gli ioni addizionati non sono tossici. Da questi esperimenti risulta come, contrariamente a quanto avviene saturando la transferrina con il ferro, la saturazione con Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} provochi un incremento della attività antibatterica, anziché un annullamento. Tale incremento appare maggiormente evidente nel caso della transferrina saturata con Zn^{2+} . I dati sono riportati nelle Fig. 1 e 2, dove si può paragonare la diversa crescita di *E. coli* in presenza di transferrina saturata con Fe^{3+} e

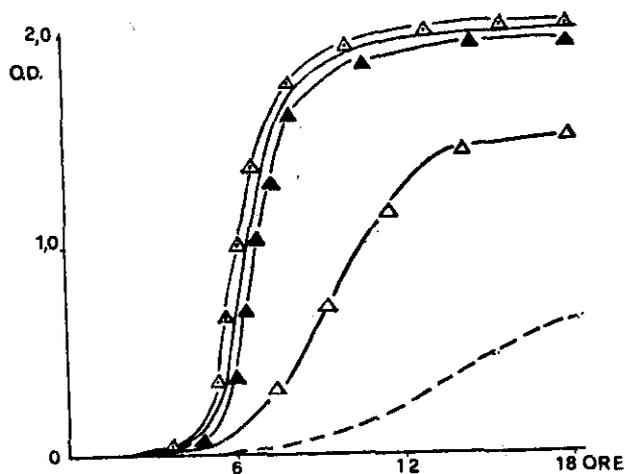


FIG. 1. - Attività antibatterica dell'ovotransferrina insatura o saturata con Fe^{3+} al 50% e al 100% nei confronti di *E. coli* W1485. Crescita in BHI come controllo (—); + Fe^{3+} 0,12 mM (Δ — Δ); + ovotransferrina 5 mg/ml (----); + ovotransferrina 5 mg/ml saturata con Fe^{3+} al 50% (\triangle — \triangle); + ovotransferrina 5 mg/ml saturata con Fe^{3+} al 100% (\blacktriangle — \blacktriangle).

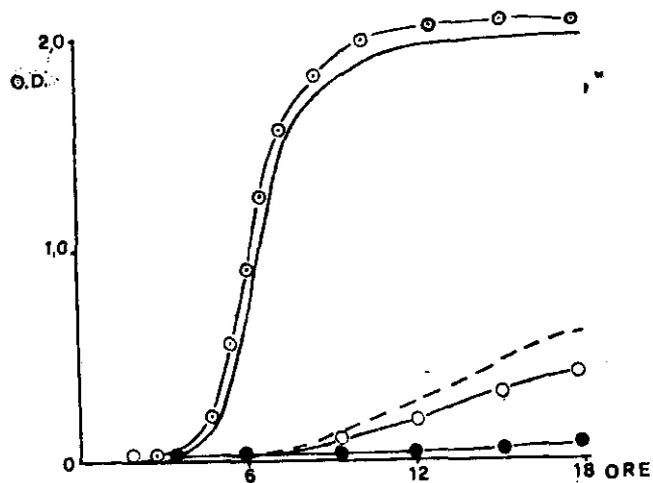


FIG. 2. - Attività antibatterica dell'ovotransferrina insatura o saturata con Zn^{2+} al 50% e al 100% nei confronti di *E. coli* W1485. Crescita in BHI come controllo (—); + Zn^{2+} 0,12 mM (\odot — \odot); + ovotransferrina 5 mg/ml (----); + ovotransferrina 5 mg/ml saturata con Zn^{2+} al 50% (\circ — \circ); + ovotransferrina 5 mg/ml saturata con Zn^{2+} al 100% (\bullet — \bullet).

di transferrina saturata con Zn^{2+} . È possibile notare come l'incremento dell'attività sia correlato alla percentuale dei siti saturati con Zn^{2+} . Analisi dei campioni allo spettrofotometro ad assorbimento atomico hanno dimostrato che i metalli da noi addizionati restano stabilmente legati ai siti dell'ovotransferrina.

DISCUSSIONE.

I risultati riportati dimostrano che il legame di alcuni ioni metallici all'ovotransferrina esalta l'attività antibatterica di questa proteina nei confronti di *E. coli*. Questo effetto:

- non è dovuto alla tossicità dei metalli di per sé, ma è presente solo quando questi sono legati all'ovotransferrina;

- è maggiore nell'ordine Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} ;

- è correlato al grado di saturazione dell'ovotransferrina.

Il potenziamento dell'attività antibatterica dell'ovotransferrina saturata in Zn^{2+} è dovuto ad un meccanismo d'azione che non può essere semplicemente spiegato con la sottrazione del ferro al terreno di coltura. Come si è detto, analisi allo spettrofotometro ad assorbimento atomico dimostrano che l'ovotransferrina saturata in Zn^{2+} non rilascia il metallo. Perciò l'ovotransferrina saturata in Zn^{2+} è incapace di legare il ferro avendo i siti saturati dallo ione Zn^{2+} . Si deve dunque presumere un differente meccanismo d'attività antibatterica dell'ovotransferrina, lo studio del quale sarà oggetto di nostre ulteriori ricerche.

BIBLIOGRAFIA

1. BEZKOROVAINY, A. 1980. Microbial iron uptake and the antimicrobial properties of the transferrins. In: *Biochemistry of non heme iron*. A. Bezkorovainy (Ed.). Plenum Press, New York and London, pp. 305-342.
2. LANKFORD, C. E. 1973. Bacterial assimilation of iron. *Crit. Rev. Microbiol.* 2: 273-331.
3. AISEN, P. 1980. The transferrins. In: *Iron in biochemistry and medicine*. A. Jacobs & M. Worwood (Eds.). Academic Press, London and New York, pp. 87-129.
4. VALENTI, P., DE STASIO, A., SEGANTI, L., MASTROMARINO, P., SINIBALDI, L. & ORSI, N. 1980. Capacity of staphylococci to grow in the presence of ovotransferrin or CrCl_3 as a character of potential pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 11: 445-447.