

PROF. LUIGI PHILIPPSON

OSSERVAZIONI INTORNO ALLA REAZIONE DI WASSERMANN NELLA SIFILIDE

Estratto dal POLICLINICO, Vol. XXI - M., 1914

m¹⁰
B
58
38

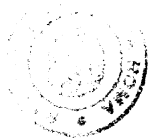
ROMA
AMMINISTRAZIONE DEL GIORNALE "IL POLICLINICO",
N. 46 - Via del Tritone - N. 46

1914

PROF. LUIGI PHILIPPSON

OSSERVAZIONI INTORNO ALLA REAZIONE DI WASSERMANN NELLA SIFILIDE

Estratto dal POLICLINICO, Vol. XXI - M., 1914



ROMA
AMMINISTRAZIONE DEL GIORNALE "IL POLICLINICO",
N. 46 - Via del Tritone - N. 46

1914

PROPRIETÀ LETTERARIA

ISTITUTO DERMOSIFILOPATICO DELLA R. UNIVERSITÀ DI PALERMO

Osservazioni intorno alla reazione di Wassermann nella sifilide

per il prof. LUIGI PHILIPPSON, direttore.

La tecnica del metodo originale della reazione di Wassermann negli ultimi anni si è andata cambiando, e questo cambiamento ha influito anche sui risultati della medesima. Le osservazioni, fatte da me in proposito, sono riunite in questa comunicazione, cui ho ancora aggiunto alcuni appunti d'indole pratica.

L'antigeno. Si sa, che il fenomeno dell'inibizione con sieri sifilitici si può avere anche con estratti di organi normali, umani ed animali, con tumori e recentemente fu trovato da Munk (*Ueber Antigene zur Wassermannschen Reaktion*. Deutsche mediz. Wochenschrift, 1912, nov. 19), che anche degli estratti vegetali, p. es. di patate, agiscono in tal modo.

Sebbene questi fatti dimostrino che l'inibizione possa verificarsi anche, senza che l'antigeno possieda la specificità, il che del resto è stato comprovato anche da altri fatti, non di meno non tutti questi estratti sono adatti a servire da reattivi nella sierodiagnosi. L'esperienza ha insegnato, che oltre il fegato sifilitico, soltanto il fegato normale, il cuore umano, il cuore di cavia e di bue forniscono degli antigeni utilizzabili.

Sul valore dei medesimi gli sperimentatori giudicano diversamente. C'è, chi dichiara gli estratti di fegato sifilitico molto superiori agli altri e non usa che quelli, mentre altri pretendono di avere gli stessi risultati anche con gli estratti di cuore.

In quanto all'estratto di cuore di cavia, io debbo dire che l'ho trovato sempre molto meno sensibile che non l'estratto di fegato sifilitico.

Intanto sta di fatto, che gli estratti di cuore in genere hanno il vantaggio, di dare di regola un antigene che può servire per la reazione. E per di più esso può

servire quasi sempre press'appoco nella stessa dose. Quindi la preparazione e la titolazione di questi estratti sono facili.

Ciò invece non può dirsi degli estratti di fegato sifilitico, i quali, anche preparati in modo eguale, forniscono degli antigeni di valore assai variabile.

Talvolta l'estratto od è tanto fortemente emolitico e anticomplementare che occorrerebbe una diluizione tale, che anche la sua proprietà di reagire coi sieri sifilitici ne soffrirebbe notevolmente, ed allora non potrà servire, oppure non differenza affatto i sieri sifilitici o se lo fa lo fa in modo incostante.

Talvolta accade ancora che un antigene, trovato buono in molteplici prove, di fronte ad un dato siero fallisce nel senso positivo o negativo.

Ogni nuovo estratto, che si mette in esperimento, deve quindi venir provato con gran numero di sieri di qualsiasi provenienza, prima che possa esser dichiarato adatto per la reazione, ed anche allora potrà succedere, come si è detto, che qualche volta fallisca.

In generale però degli antigeni esattamente titolati danno dei risultati identici. Intanto, per aver maggiore sicurezza nei risultati, si raccomanda di eseguire la reazione sempre con più antigeni contemporaneamente, oltre quelli che si usano, per provarli e titolarli.

Per determinare la dose di lavoro dell'antigene si adoperava dapprima la prescrizione, che tutt'ora vale per tutte le ricerche basate sulla deviazione del complemento, si stabiliva cioè la dose minima dell'antigene che dava inibizione, e se ne pigliava la metà.

Oggi invece pare, che questa regola non venga più osservata da molti sperimentatori. Chiaramente si esprime sul riguardo il Brauer (*Sierodiagnosi della sifilide* 1912):

« La quantità dell'estratto non si deve portare alla metà della dose inibitrice, come fu proposto, perchè allora molti sieri luetici sfuggirebbero alla diagnosi ».

Io stesso ho visto in antigeni, ritirati da Istituti che li mettono in vendita già titolati, che la titolazione non era fatta col vecchio criterio.

Onde intendere bene, quale influenza abbia questa innovazione sulla tecnica medesima e conseguentemente anche sui risultati della reazione, occorre che noi ci occupiamo un poco della proprietà emolitica e anticomplementare degli antigeni.

Gli estratti di organi in genere in una certa quantità sono emolizzanti, ed in quelli preparati con alcool, vi contribuisce anche questo veicolo. P. e. un estratto che fino alla dose di 0.1 si comporta indifferentemente verso i globuli rossi, incomincia già a discioglierli un poco nella dose di 0.12 o di 0.15 entro 1 ora e produce emolisi completa nella dose di 0.2.

Questa proprietà emolitica delle dosi minori viene compensata dall'aggiunta di siero, che dappersè non è emolitico per i globuli, p. e. nel caso di globuli di montone dall'aggiunta di siero umano inattivato o di siero di cavia. Per l'esperimento alle dosi prima usate dell'antigene, si aggiunge, p. e., 0.1 di siero, si lascia la miscela un'ora nel termostato e si aggiungono poi i globuli. Allora si osserva, che nelle dosi di 0.12 fino a 0.15 e magari al di là l'emolisi non si verifica più mentre in dosi maggiori ciò succede ancora.

Contro una certa quantità di antigene dunque, il siero si dimostra atto a proteggere i globuli.

A provare la proprietà anticomplementare dell'antigene, si tiene la miscela di antigene (nelle varie dosi) con una stessa quantità di complemento p. e., 0.05, per un'ora nel termostato e vi si aggiunge poi il sistema emolitico.

Nelle quantità di antigene in cui esso è indifferente verso il complemento, si dovrà avere emolisi, nelle quantità invece in cui l'antigene distrugge il complemento, l'emolisi non dovrà avvenire. Qui però bisogna tener conto ancora della proprietà emolitica dell'antigene e della proprietà protettrice del siero, in questo caso del siero di cavia, verso i globuli, le quali influiscono pure sul risultato dell'esperimento.

Così si spiegano i fatti seguenti: nelle dosi, in cui l'antigene dappersè si comporta indifferentemente verso i globuli si ha difatti emolisi. Tenendo conto del tempo in cui si compie l'emolisi, si riconosce già l'influenza deleteria dell'antigene sul complemento, perchè a misura che la quantità dell'antigene aumenta rallenta anche l'emolisi.

Si ha emolisi anche con quelle dosi di antigene le quali dappersè sono emolitiche, ma non lo sono più coll'aggiunta di siero. Qui si aspetterebbe quasi piuttosto una emolisi più rapida di quella di prima, perchè alla proprietà emolitica dell'antigene vi si aggiunge ancora quella del complemento più ambocettore. Invece succede il contrario, perchè da un lato il siero di cavia protegge i globuli contro l'azione dell'antigene e nello stesso tempo esso viene già influenzato dalla proprietà anticomplementare del medesimo. L'emolisi si dimostra qui perciò ancora più rallentata, dimodochè dopo un'ora nelle dosi più basse dell'antigene essa risulta magari ancora completa, mentre nelle dosi più alte o rimane incompleta o non avviene più del tutto; si ha cioè inibizione.

Al di là di questa zona di emolisi incompleta e d'inibizione si nota invece di nuovo emolisi e qui essa può avvenire magari più presto che non nelle dosi più basse dell'antigene. Questo fatto in apparenza contraddittorio si spiega semplicemente col forte potere emolitico che l'antigene possiede in quantità maggiore. Questa emolisi non dipende quindi affatto dal complemento e dall'ambocettore e non va confusa con quella prodotta dal complemento nelle dosi più basse dell'antigene.

Come i globuli vengono protetti verso l'antigene per l'aggiunta di siero, così anche il complemento può venir protetto verso lo stesso pure per l'aggiunta di siero. I sieri che posseggono questo potere sono dei sieri umani normali inattivati. In generale, come si sa, anche i sieri normali sono anticomplementari, ma in un grado tanto lieve che questa loro proprietà non si esplica menomamente nella reazione propriamente detta e non diventa evidente, che in esperimenti d'emolisi fatti di proposito. Intanto eseguendo la reazione di Wassermann con una dose di antigene, la quale da sola inibisce in grado più o meno forte, spesso volte si osserva, che pur nondimeno nelle prove con sieri normali, in cui l'inibizione si aspetta di trovare ancora più pronunziata, avviene appunto il contrario, e cioè si trova emolisi completa.

Nella serie delle varie quantità dell'antigene si hanno quindi da distinguere tre

zone differenti. Una prima zona delle dosi basse, in cui l'antigeno si dimostra indifferente sia verso i globuli che verso il complemento. Indifferente verso i globuli, inquantocchè anche un contatto prolungato li lascia integri ed indifferente verso il complemento, inquantocchè anche dopo un contatto prolungato questo conserva la sua proprietà di agire sul sistema emolitico.

Nella seconda zona invece l'antigeno non riesce più indifferente nè verso i globuli, nè verso il complemento: i globuli vengono emolizzati ed il complemento viene distrutto, dimodochè non è più capace di produrre emolisi col sistema emolitico.

Nelle dosi più basse di questa zona però la proprietà emolitica può ancora essere paralizzata dall'aggiunta di siero, come succede coll'aggiunta di siero di cavia quale complemento, e in ugual modo la proprietà anticomplementare può ancora esser paralizzata dall'aggiunta di siero umano inattivato.

Infine nella terza zona il potere emolitico dell'antigeno è tanto forte che non vien più compensato dall'aggiunta di siero.

Come s'intende, la distribuzione in zone non ha che significato didattico; in realtà il passaggio si spiega gradatamente. Nei varii estratti, anche della stessa provenienza, ma principalmente in quelli di fegato sifilitico, vi sono grandi differenze sul riguardo: in certi il passaggio avviene piuttosto rapido, in altri più lento. La seconda zona, in altre parole, è più o meno larga e quindi le dosi emolitiche e anticomplementari che coll'aggiunta con siero possono venire condotte allo stato indifferente più o meno numerose.

Sullo spostamento dei limiti delle zone influisce naturalmente anche la qualità dei globuli e del complemento. Qualora i globuli siano meno resistenti, la seconda zona scende a dosi più basse e lo stesso effetto ha anche un complemento meno resistente verso l'influenza dell'antigeno.

Eseguito la reazione completa con sieri sifilitici e non sifilitici (esclusi quelli derivanti da malattie, che danno anch'esse delle inibizioni) ed usando, a scopo di puro sperimento, l'antigeno in quantità che corrispondono non solo alla prima zona, ma anche alla seconda, si ha per risultato che i sieri non sifilitici danno emolisi completa nella prima zona e nelle dosi basse della seconda zona. Nelle dosi maggiori, in cui l'antigeno da solo incomincia già ad inibire la maggior parte dei sieri dà ancora emolisi completa, in altri l'emolisi risulta già incompleta ed in alcuni si ha addirittura inibizione. Le dosi ancora maggiori di antigeno poi producono inibizioni in tutti quanti i sieri.

I sieri sifilitici, come si sa, si comportano diversamente: perchè nella prima zona sono già in parte inibitori. Nelle dosi più basse della medesima cioè ammettono ancora emolisi completa, e quindi incominciano ad inibire in una percentuale piccola, la quale rapidamente cresce, a misura che noi ci avviciniamo al mezzo della zona. Qui è un terzo o la metà di tutti i sieri sifilitici, che danno inibizione, mentre il resto dà ancora emolisi.

Coll'aumento dell'antigeno cresce ancora rapidamente il numero dei sieri che danno risultato positivo, ma ne rimangono di quelli che danno ancora emolisi. Passando nella seconda zona la reazione progredisce nello stesso senso, dimodochè i casi di emolisi vanno scomparendo ed alla fine tutti quanti i sieri inibiscono.

Una differenziazione fra i sieri sifilitici e non sifilitici non si ha quindi nè nelle dosi più basse della prima zona, nè nelle dosi maggiori della seconda. Si ha invece in tutto il resto della prima zona e nelle dosi basse della seconda. Al di là invece essa incomincia a perdersi di nuovo rapidamente.

Ma anche, laddove esiste una differenziazione, non tutti quanti i sieri sifilitici reagiscono nel senso positivo, ne rimane sempre un numero più o meno grande che dà emolisi come i sieri non sifilitici.

Ora il Wassermann, applicando la sua scoperta alla clinica e facendone un metodo di siero-diagnosi della sifilide, mirava ad avere delle inibizioni soltanto nella sifilide e mai in altre malattie, nè in sani. La sua tecnica era quindi imposta in modo tale, da escludere assolutamente quei fattori, che potrebbero contribuire a fare comparire delle inibizioni fuori della sifilide, e cioè, riguardo all'antigeno, le dosi vicine a quelle anticomplementari. La dose di lavoro restava anzi la metà sotto di queste, sia perchè allora si usava l'estratto acquoso di fegato, che era meno costante di quello alcoolico oggi in uso, sia perchè si voleva escludere l'influenza dell'incostanza del complemento, che sempre senza prove preliminari fu usato nella quantità di 0.1.

Oramai invece la dose di lavoro dell'antigeno viene scelta al di là della metà e non si esita neanche di usarlo in una dose che non è più indifferente verso uno dei reattivi, e cioè verso i globuli. Questa dose emolitica però è ammissibile, purchè l'emolisi venga paralizzata dall'aggiunta di siero, in guisa che non possa più influire sull'esito della reazione. Difatti, come abbiamo già detto, i risultati della reazione eseguita con simile dose, sono, di regola, non solo giusti, ma permettono anzi di avere un numero di reazioni positive molto maggiori di prima. Gli è stato naturalmente questo il desiderio, che ha spinto al cambiamento della tecnica originale.

Intanto vi subentrano anche delle difficoltà e degli inconvenienti che prima non esistevano. Se il metodo originale era già delicato, ora lo diventa ancor di più e specialmente perchè anche altri cambiamenti vi sono stati apportati riguardo al complemento ed al tempo della reazione, di cui noi parleremo in appresso.

Anzitutto la titolazione dell'antigeno riesce molto più difficile, perchè non si tratta più di stabilire con unica prova la dose di lavoro, ma invece si debbono fare delle prove con molti sieri onde determinare con quale dose si abbia la differenziazione fra sieri sifilitici e non sifilitici e in contempo anche il massimo dei risultati positivi con quelli.

Dopo una serie di esperienze si trova infine, che questa tale dose oscilla fra delle quantità, che distano soltanto di pochi centesimi.

Lavorando con una dose che è già vicina a quelle tali in cui l'antigeno diventa anticomplementare, accade poi che ogni minimo difetto di reattivi si fa subito risentire.

Riguardo al complemento ancora il pericolo di un difetto è aumentato già per il fatto, che esso, come vedremo più innanzi, viene usato nella quantità di 0.05 invece che di 0.1.

I sieri normali e quelli di malattie, che non dovrebbero dare reazione positiva,

possono eccezionalmente avere un potere anticomplementare sufficiente per influire sulla reazione nel senso d'inibizione.

Infine vi sono ancora altri fattori non riconoscibili e non controllabili, che fanno sì che ora succedano nella reazione dei turbamenti molto più spesso di prima e che ci costringono quindi con più frequenza a ripetere la prova.

Teoricamente parlando, la dose di lavoro dell'antigeno si potrebbe portare ancora più in alto, perchè, come abbiamo visto, anche il potere anticomplementare del medesimo in un certo grado si può compensare coll'aggiunta di siero avendo così per la sifilide un maggiore numero di reazioni positive. Però non è escluso che, così facendo, anche qualche siero che dovrebbe dare emolisi dia invece inibizione. Quindi per la reazione tale dose non può servire.

Eppure io debbo dire, che fra gli antigeni, ritirati da Istituti, ne ho trovati parecchi, i quali erano titolati in questa maniera. Essi da soli nella dose di lavoro, spesse volte inibivano, mentre poi nella dose con sieri normali di solito davano emolisi completa. Succedeva però anche che dei sieri normali risultavano positivi, in numero più o meno grande, a secondo gli antigeni.

E pensando ora che nelle statistiche recenti della sierodiagnosi la percentuale di reazioni positive nella sifilide terziaria manifesta da 30, 40, come era prima, è salita a 80 e 90, mi viene il dubbio, se ciò non possa dipendere in gran parte dall'alta titolazione dell'antigeno. Questo dubbio, mi pare, non sia senza fondamento, se si leggono delle parole, come le seguenti pronunziate dal Müller a proposito della reazione di Wassermann al Congresso Intern. dermat. e sifilogr. a Roma nel 1912 (Rendiconti 1913, pag. 487):

« Direi quasi, che una titolazione, fatta in modo che l'inibizione avvenga soltanto con sieri sifilitici e mai con sieri non sifilitici, è addirittura inservibile per la pratica, perchè la reazione ne diventerebbe tanto debole, che reagirebbe soltanto un numero troppo esiguo di sieri sifilitici, epperò la reazione negativa perderebbe ogni valore diagnostico ».

* * *

Dobbiamo noi usare questa nuova titolazione dell'antigeno nella pratica clinica?

A questo proposito io ritengo necessario fare una distinzione netta fra le diverse applicazioni che si fanno della reazione: essa va applicata a sieri o di sifilitici o di persone di cui non si sa se siano o no sifilitici. Soltanto in quest'ultimo caso la reazione ha il significato di un mezzo diagnostico vero e proprio, mentre non lo ha più quando si tratta di sieri di sifilitici. Difatti la reazione non serve qui che a rivelarci un fatto patologico, da aggiungere agli altri che abbiamo già stabiliti precedentemente sia per mezzo dell'anamnesi, che dei precedenti patologici, dell'esame obbiettivo, ecc.

Ricorrendo alla reazione in casi di sifilide, noi lo facciamo in altri termini soltanto per completare l'esame dell'ammalato, come noi sogliamo farlo, ricercando tutti quanti i sintomi, insegnatici dalla sifilografia, senza riguardo al loro valore pratico.

Ora, siccome colla nuova titolazione dell'antigeno si riesce a mettere in evidenza molto più sieri sifilitici, che non colla titolazione originale, si preferirà quella, sebbene abbia il difetto di dare inibizione talvolta anche con sieri non sifilitici. Non può derivarne un danno, perchè noi non facciamo altro che una ricerca complementare all'esame clinico.

Molto diversamente stanno le cose, quando la reazione vuole applicarsi a scopo diagnostico. Intendo parlare dei casi, in cui nè l'esame obbiettivo, nè i precedenti patologici, nè l'anamnesi ci forniscono dei dati precisi, per ammettere l'infezione sifilitica e nei quali perciò la prova della siflide, fornita dalla reazione, verrebbe a costituire l'unico fatto obbiettivo della malattia. Sono quei casi, in cui il ragionamento clinico ammette l'ipotesi della siflide, onde avere un indirizzo terapeutico e nei quali si intraprende la cura specifica a titolo di prova.

Ora se si desidera avere ancora un appoggio nella reazione di Wassermann, di certo noi non vogliamo procurarcelo a costo della sicurezza e dell'esattezza. Quindi si eviterà anche una tecnica che può esporci a far delle costatazioni false e quindi degli errori diagnostici. La tecnica moderna va quindi scartata e noi ci atteniamo alla tecnica originale, che prescrive l'uso della metà della dose massima dell'antigeno. L'unica modificazione che ci possiamo permettere si è quella di servirci della metà del complemento e cioè di 0.05, anzichè di 0.1. Può bensì essere che, procedendo in questo modo, la reazione riesca negativa nei casi di siflide, ma allora noi sappiamo già che questo risultato non esclude affatto questa malattia.

* * *

Dal Wassermann stesso era stato prescritto di usare il siero di cavia nella quantità costante di 0.1. Siccome per lo più nella prova del sistema emolitico bastano già 0.02 fino a 0.03 del medesimo, per avere emolisi completa colla dose minima dell'ambocettore, il multiplo di certo è stato scelto di proposito, onde eliminare una volta per sempre tutti quei difetti nell'andamento della reazione che potrebbero verificarsi sia per il contenuto variabile di complemento nel siero di cavia, che per il potere anticomplementare degli antigeni e dei sieri non sifilitici da esaminarsi. E difatti, se nella prova del sistema emolitico la dose di 0.1 di complemento funziona bene, nella reazione stessa si è al riparo di cause di errori da parte di questo reattivo. Soltanto molto di rado succede che a reazione finita si trova in tutte le prove di controllo un piccolo fondo di emazie non disciolte, il quale indica poi l'insufficienza del complemento, senza che il valore della reazione ne venga toccato.

L'uso della quantità costante di 0.1 viene ancora mantenuto dallo stesso Wassermann nel 1910 (*Münch. Med. Woch.*, n. 24) e dal Citron nel 1909 (*Handb. Technik u. Methodik der Immunitätsforschung*).

Invece di 0.1 oggi si usa generalmente 0.05 di complemento e pare che anche il Wassermann stesso abbia adottato questo innovamento, perchè almeno nella istruzione, fornita dall'Istituto sieroterapico Milanese per la reazione originale di

Wassermann, si legge in proposito « che viene usato nella quantità costante di cmc. 0.05 ».

La ragione di questa riduzione a metà si è che si vuole aumentare l'affinità del complemento al complesso di antigeno più siero e diminuire la sua affinità alle emazie sensibilizzate. Questa innovazione mira quindi allo stesso scopo che l'aumento della quantità di antigeno e difatti anch'esso contribuisce da parte sua a dare risultati positivi con dei sieri sifilitici i quali al metodo originale si sottraggono.

Intanto succede anche qui lo stesso fatto come per la nuova titolazione dell'antigene. Colla quantità di 0.05 noi siamo arrivati al limite della quantità strettamente necessaria, perchè la reazione possa svolgersi tipicamente, epperò ora delle proprietà speciali di un dato siero di cavia, che nel metodo originale non si fanno valere, in questo caso si fanno risentire alterando più o meno il risultato della reazione. E ciò succede ancora più facilmente, qualora colla dose minima si accoppia la dose massima di antigene, che, come abbiamo già esposto, agisce nello stesso senso.

Il siero di cavia, oltre la sua proprietà di servire da complemento, deve possederne ancora un'altra e cioè quella di poter resistere all'influenza dell'antigene. Ciò diventa palese nell'osservazione seguente: talvolta succede che il complemento nella dose di 0.05 nella reazione si dimostra insufficiente ed allora neanche l'aumento della quantità riesce a togliere il difetto, mentre la stessa quantità funziona bene nella prova del sistema emolitico.

Si osserva inoltre talvolta che lo stesso complemento funziona bene nella prova di controllo di un antigene, mentre fallisce più o meno in quella di un altro, usato nello stesso sperimento.

La regola generale di usare il siero di cavia senz'altro in una dose costante, come quella di 0.05, va quindi abbandonata. Si può usarlo in questa dose soltanto, dopo aver fatto delle prove preliminari col sistema emolitico, nel quale entro un determinato tempo esso deve produrre emolisi completa. Questo tempo varia naturalmente a secondo il titolo dell'ambocettore ed a secondo che si fa la prova colla dose semplice o multipla del medesimo. Ho trovato che in generale colla dose doppia fino a triplice dell'ambocettore il complemento nella dose di 0.05 deve dare emolisi completa entro 10-15 minuti (a secondo le qualità degli antigeni), per essere adatto per la reazione, altrimenti dev'essere scartato.

Il complemento si può provare ancora in altro modo. A tale scopo si fanno due specie di prove: prima si fa una prova, per vedere se il siero di cavia nella quantità di 0.05 entro un'ora dia l'emolisi completa, coll'unità di ambocettore stabilita già precedentemente e poi si ripete la stessa prova con dosi decrescenti del siero di cavia. Qualora già quantità minori di 0.03 del medesimo bastino a produrre emolisi completa, esso può servire per la reazione, altrimenti no.

Qualche autore consiglia ancora di non contentarsi della sola prova di fronte al sistema emolitico, ma di farla pure di fronte all'antigene. A proposito dell'antigene noi abbiamo già parlato delle osservazioni che hanno dettato questo consiglio e cioè che talvolta un complemento che funziona bene nella prova del sistema emolitico fallisce nella prova di controllo dell'antigene.

L'inattivazione dei sieri è prescritta non solo allo scopo di distruggere il complemento, ma anche perchè il siero inattivato si conserva meglio. Difatti i sieri non preparati in questo modo più o meno presto acquistano proprietà anticomplementare, per cui inibiscono già da soli. A rimediare, si è proposto d'inattivarli poi, ma ciò non riesce sempre allo scopo.

Con ragione si richiama l'attenzione sul modo di eseguire l'inattivazione, perchè una inesattezza sul riguardo può portare degli errori nei risultati della reazione. Dei sieri difatti non riscaldati sufficientemente o riscaldati troppo acquistano la proprietà d'inibire, che prima non avevano. Se lo sperimentatore non ha, lui stesso, eseguito l'inattivazione e non sospetta neanche che sia stata fatta inesattamente, può succedere che non se ne accorge nemmeno, perchè del difetto di tecnica non tutti i sieri risentono in modo uguale. Vi sono sieri a reazione negativa che la mantengono tale anche senza essere inattivati, mentre altri danno in tal caso inibizione e perdono questa proprietà col riscaldamento in tempo molto differente: alcuni presto, altri soltanto nel tempo prescritto come regola generale. Perciò gli può accadere che più sieri trattati insieme che tutti dovrebbero dare reazione negativa, in parte la danno, in parte invece no, senza che questo errore diventi palese.

I sieri vengono messi per mezz'ora in bagnomaria a 55° fino a 56°. Il termometro non deve essere usato perchè il riscaldamento vi avviene troppo lento ed in modo inuguale. In caso di bisogno, si controlla l'inattivazione insufficiente colla prova della proprietà emolitica del siero.

Per conservare i sieri a lungo è utile metterli in fialette saldate che si tengono in ghiacciaia. In tal modo per lo più essi si mantengono tali e quali per delle settimane intiere. Tuttavia in certi sieri preparati con tutte le cautele e senza che in essi sia avvenuto un inquinamento batterico, si verifica la stessa alterazione che subiscono i sieri non inattivati, si sviluppa cioè una proprietà anticomplementare per cui inibiscono già da soli.

Di ciò il Wassermann ebbe già a parlare nella sua prima pubblicazione sulla siero reazione a proposito di sieri che mentre prima davano emolisi, dopo un certo tempo inibivano senza che il loro aspetto fosse per nulla cambiato.

Sul proposito io ho fatto degli esperimenti da cui risulta che vi sono grandi differenze nell'alterabilità dei sieri. Fra i sieri esaminati ripetutamente, n'erano di quelli che si mantenevano costantemente inalterati per parecchie settimane, mentre altri regolarmente si alteravano più o meno presto.

Ripetendo la reazione ad intervalli di pochi giorni sullo stesso siero ho potuto osservare come il potere anticomplementare si sviluppa in essi a poco a poco. In principio esso si fa evidente soltanto in presenza dell'antigeno, mentre la prova di controllo del siero a solo riesce ancora tipica. In seguito si ha anche qui inibizione, e questo cambiamento della reazione, ripeto, avveniva senza che l'aspetto del siero

fosse per nulla cambiato e senza che vi fosse sviluppo batterico. Il siero si presentava sempre perfettamente limpido.

La stessa alterazione succede anche nei sieri sifilitici, ma s'appalesa naturalmente, soltanto nella prova del siero a solo.

Ora, se si ha da eseguire la reazione sopra un siero, che non si conosce e che ha già incominciato a subire quell'alterazione, ben s'intende, che si constaterà con sicurezza inibizione, perchè il controllo darà ancora emolisi e così si farà una diagnosi erronea.

Dal sovraesposto si trae pertanto l'insegnamento che i sieri, oltre che essere inattivati al più presto possibile devono essere anche esaminati al più presto, almeno, cioè, entro i primi 4 giorni, e che il sangue ed il siero non inattivato, mandati per posta per l'esame, non danno affidamento.

*
* *

Le prescrizioni riguardo al *tempo*, in cui si deve considerare la *reazione* come terminata ed in cui si devono leggere i risultati variano notevolmente da un autore all'altro.

Il Wassermann aveva parlato di due ore, oggi invece è in uso soltanto un'ora. C'è chi stabilisce poi il risultato immediatamente, mentre altri lo fanno dopochè le prove sono rimaste nella ghiacciaia fino all'indomani.

Il Citron invece dà quale regola generale « che la reazione sia da considerarsi come terminata quando in tutti i controlli, in cui deve risultare emolisi, essa sia avvenuta, mentre nelle prove, in cui sia da aspettarsi la fissazione del complemento, non vi sia emolisi oppure emolisi incompleta, la quale non progredisca affatto e soltanto molto lentamente ». Ed aggiunge: « il tempo, in cui ciò avviene, varia assai e deve provarsi per ogni emolisina ».

E nell'istruzione per la reazione originale di Wassermann, edita dall'Istituto sieroterapico Milanese, è detto:

« La valutazione dei dati dopo una conservazione di 24 ore in ghiacciaia non è indicata, perchè in queste condizioni si ottiene talvolta emolisi anche nei sieri sifilitici ».

La prescrizione di Wassermann aveva lo scopo di avere quali risultati della reazione o delle inibizioni o delle emolisi complete, senza i gradi intermedi che potessero difficolare l'interpretazione dei risultati. Oggi invece l'esperienza ha insegnato, che anche un'ora è già sufficiente, per aver quei risultati che la reazione può dare e d'altro lato s'è visto che un soggiorno maggiore nel termostato fa perdere dei risultati in quanto ai sieri sifilitici. Il tempo non influisce, qualora si tratti di reazioni, in cui non si ha il benchè minimo accenno all'emolisi; esse si conservano tali quali, anche nel termostato e nella temperatura dell'ambiente per più di 24 ore. Invece nelle reazioni, in cui, per quanto tardi, p. e. dopo mezz'ora s'inizia l'emolisi e progredisce lentamente, il tempo, in cui si interrompe la reazione, risulta di massima importanza. Chi prolungherà il soggiorno nel termostato al di là di un'ora

troverà emolisi, chi ha stabilito un'ora per la reazione costaterà inibizione parziale e chi procederà secondo il Citron diagnosticherà inibizione senz'altro.

Questa differenza nei risultati viene ancora influenzata dalla qualità degli antigeni. Ve ne sono di quelli, in cui, una volta interrotta la reazione e conservate le prove in ghiacciaia, i risultati rimangono inalterati, mentre ve ne sono degli altri in cui una emolisi iniziata continua lo stesso e diventa infine completa.

Per questa ragione l'istruzione dell'Istituto Milanese sopracitata rigetta la lettura dei risultati dopo 24 ore. Ma questo succede soltanto quando l'antigeno viene usato in una dose fortemente emolitica, per cui infine esso stesso provoca l'emolisi. Negli antigeni invece che non hanno questo difetto, anche delle inibizioni di lievissimo grado, che a reazione terminata si presentano soltanto quale velatura di tutta la colonna rossa, si conservano benissimo anche 24 ore.

* *

Tenendo conto non solo del risultato della reazione ma ancora del tempo in cui si *compie l'emolisi* in quelle prove in cui *essa* deve avvenire, si constata una grande differenza fra i sieri umani. Questa differenza si osserva già nelle prove del potere anticomplementare dei sieri a soli e si ripete poi corrispondentemente anche nelle prove dei sieri coll'antigeno.

Nelle prime prove l'emolisi per lo più termina entro il tempo in cui si *compie l'emolisi* nel sistema emolitico, come esso viene usato per la stessa reazione. Il potere anticomplementare non vi si fa valere.

Intanto non di rado si osserva rallentamento dell'emolisi, talchè nello stesso sperimento in tutte le altre prove essa è già completa, mentre in qualcheduna l'emolisi non è ancora terminata od appena iniziata. In questa l'emolisi si svolge più lentamente ad impiega il doppio del tempo delle altre. Più rari sono i sieri il di cui poter anticomplementare è tanto forte da ritardare l'emolisi fino al termine della reazione cioè fino ad un'ora. In ultimo s'incontrano, sebbene assai di rado, dei sieri, i quali addirittura non ammettono più emolisi. Fu per questo fatto, già conosciuto fin dai primi tempi, che si rese necessaria la prescrizione tecnica di controllare ogni siero riguardo al suo potere anticomplementare. Quando esso è tanto forte da inibire del tutto l'emolisi, la reazione non vi può essere eseguita.

L'emolisi, nella prova propriamente detta dei sieri normali, avviene sempre più tardi che non nella prova di controllo dei sieri in generale, perchè vi si aggiunge il potere anticomplementare degli antigeni.

Per questo fatto nei sieri normali, i quali già dapprima ritardano l'emolisi, il ritardo diventa ancora più evidente e nello stesso sperimento pertanto si possono osservare le più grandi differenze di tempo nello sviluppo delle emolisi.

Per lo più l'emolisi, compiutasi nella prova di controllo, non tarda ad iniziarsi anche in quella fatta con siero più antigeno, ma non è affatto raro osservare che l'emolisi si fa aspettare di più o di meno. Così, mentre p. e. l'emolisi in un esperimento nel massimo numero delle prove con sieri normali, si fa completa in 15-20

minuti, in altre prove vi occorrono 30 minuti ed anche allora in alcune l'emolisi incomincia soltanto ad iniziarsi, per poi completarsi nel termine giusto stabilito oppure per rimanere più o meno incompleta.

Questo fatto si verifica anche, usando un titolo non molto superiore a quello originale, ma diventa più frequente e più pronunziato colla titolazione moderna.

*
* *

In tutte le pubblicazioni che si occupano dei risultati dati dalla reazione di Wassermann si rileva sempre il fatto che i sieri normali non danno mai inibizione e nei casi, in cui certi autori hanno trovato reazione positiva e che si riferiscono ad altre malattie che non siano scarlattina, lebbra, malaria e via dicendo, od a persone sane, si attribuisce questo risultato ad errori di tecnica od a sifilide ignorata e latente.

Questo modo di considerare le cose non mi pare che abbia ragione di essere, perchè i risultati che dà la R. W. non dipendono soltanto nè esclusivamente dalla provenienza dei sieri, ma ed innanzi tutto, dallo stesso sperimentatore.

Difatti è egli stesso che regola la reazione in modo tale da non avere inibizione coi sieri non sifilitici. Quando egli incomincia a provare un nuovo antigene, ciò invece gli succede regolarmente ed allora occorre diminuire la quantità dell'antigene da usarsi nella reazione. E così di seguito si continua ad abbassare il titolo dell'antigene, fino a quando, dopo aver provato 20, 30, 50 sieri non sifilitici si arriva ad un titolo, il quale poi si dimostrerà utilizzabile anche per tutti gli altri.

Stando così le cose, il fatto che i sieri non sifilitici non danno inibizione non può sorprendere, appunto perchè vien creato da noi stessi. In principio invece, allorchando la reazione fu ritenuta come specifica per la sifilide e quando si prescrive rigorosamente la quantità dell'antigene e cioè allora 0.2 dell'estratto acquoso del fegato sifilitico, la contraprova con sieri normali si presentava quale fatto a sè, perchè dipendente dal titolo già precedentemente stabilito.

La quistione, se i sieri normali diano o no inibizione, oggi non ha quindi più alcun senso ed è rimasta dal tempo, in cui si credeva ancora alla specificità della reazione.

Invece di essa si deve sollevarne piuttosto un'altra, e cioè, se sia veramente possibile titolare un antigene in modo tale, da avere la massima percentuale di reazioni positive nella sifilide, senza che mai altri sieri diano inibizione. Secondo le mie esperienze io debbo negarlo.

*
* *

Quando nella tecnica avvengano dei difetti o degli errori, questi si fanno sentire più nel senso positivo che nel negativo, e perciò non riuscirà superfluo enumerare qui le *cause di errore* più comune che fanno comparire positivo un siero che dovrebbe invece dare emolisi.

1. Gli antigeni, titolati secondo l'uso odierno, i quali in altre prove non hanno dato inibizione con sieri normali, talvolta la danno, perchè ve ne sono di quelli che hanno un potere anticomplementare così grande da arrivare al grado dei sieri sifilitici a reazione debole.

2. Vi sono degli antigeni, sui quali il modo di diluirli, influisce sul loro potere anticomplementare. La diluizione lenta che conferisce al liquido un aspetto più opaco lattiginoso aumenta questo potere, dimodochè può determinare una falsa inibizione.

3. Il siero di cavia anche fresco talvolta può contenere il complemento in quantità insufficiente, cosicchè la regola di usarlo nella dose costante di 0,1, o in quella di 0.05 conduce ad inibizioni false.

Neanche la prova preventiva del complemento nelle stesse dosi col sistema emolitico mette al riparo di tale errore, perchè con questa non si tien conto della proprietà che nella reazione deve possedere il complemento e cioè di resistere all'influenza dell'antigeno. Occorrono quindi le prove, di cui abbiamo parlato sopra.

4. Vi sono dei sieri non sifilitici, esclusi quelli provenienti dalle malattie che nella W. si comportano come la sifilide, che possono dar inibizione per varie ragioni:

a) quando essi non siano stati inattivati breve tempo dopo la loro separazione dal coagulo del sangue;

b) quando essi non siano stati inattivati affatto, oppure insufficientemente.

Non tutti i sieri però danno in queste circostanze inibizione; ve ne sono di quelli i quali, anche se la prescrizione sul modo di prepararli non sia stata osservata, reagiscono tipicamente. Questa diversità contribuisce a nascondere l'errore commesso, perchè può succedere che si verifichi per caso fra più prove di sangue, trattate insieme;

c) quando siano stati troppo riscaldati;

d) quando vengono inattivati, contenenti ancora globuli rossi;

e) infine dei sieri inattivati e conservati bene dopo un certo tempo possono alterarsi in modo tale che inibiscono. Questa alterazione può verificarsi nei primi giorni soltanto in presenza dell'antigeno, mentre non si rivela ancora nella prova di controllo del solo siero.

* * *

Degli antigeni commerciali. — Da Istituti scientifici vengono messi in vendita degli estratti, fatti da fegato sifilitico o, come è detto genericamente, da organi sifilitici. Sono titolati e qualche volta anche accompagnati da una istruzione sulla tecnica della reazione. Gli è bene sapersi che la titolazione vien fatta dagli Istituti con criteri differenti.

Secondo le mie esperienze l'antigeno preparato sotto il controllo dello stesso Wassermann, vien titolato secondo la regola del metodo originale e corrisponde quindi alla metà della dose minima inibitrice. Il numero dei risultati positivi nei sieri sifilitici, forniti da questo antigeno, è press'a poco uguale a quello che fu trovato già nei primi anni in cui si conobbe questo metodo.

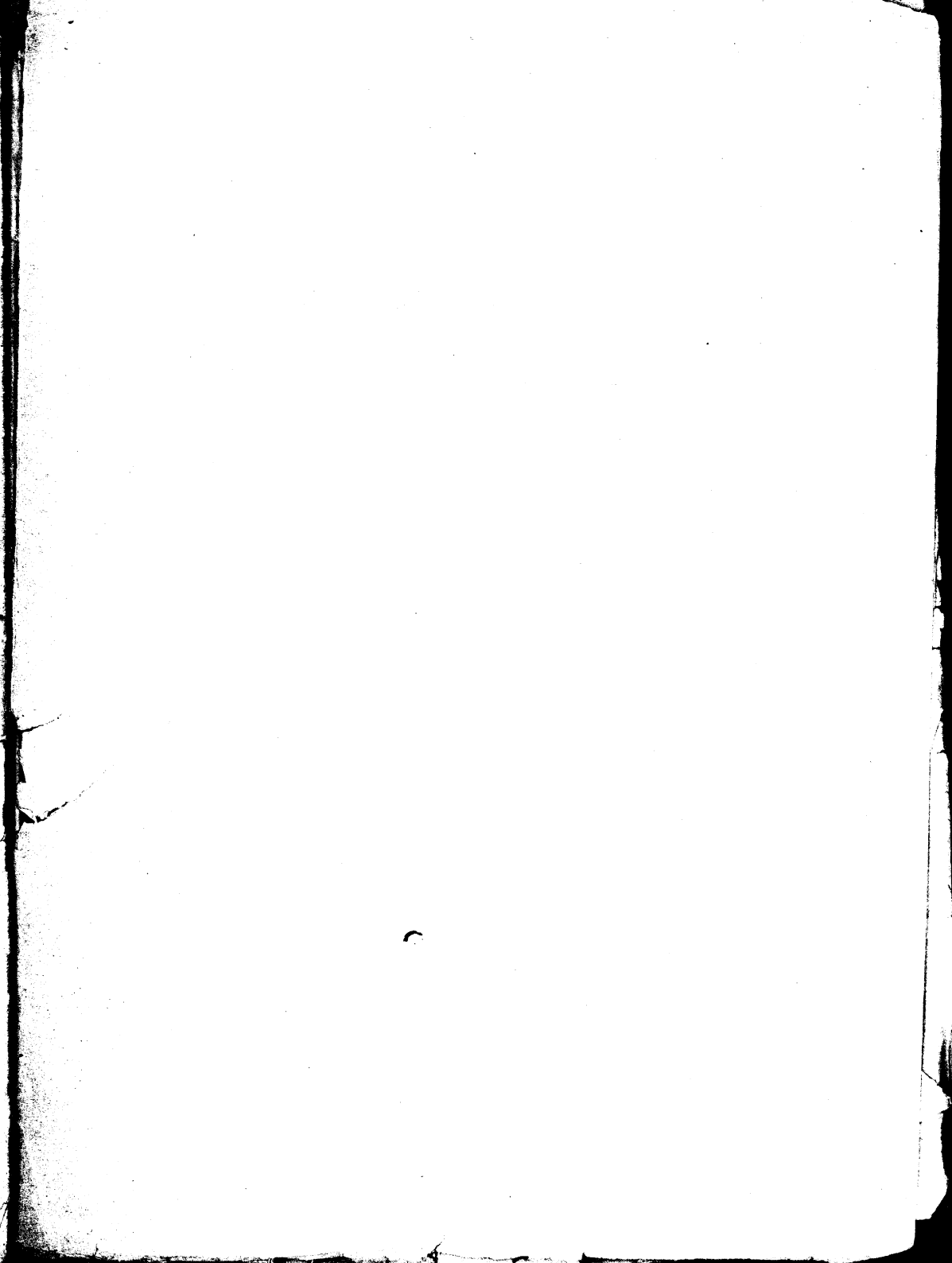
Confrontato col risultato che dà il cuore di cavia, si può dire che l'antigeno del Wassermann non sta che alla pari col medesimo.

Gli antigeni invece, preparati dagli Istituti di Berna e di Milano, portano un titolo più alto. La dose di lavoro è già più o meno emolitica ed è più o meno vicina alla zona inibitrice. Questi antigeni danno perciò nella sifilide una percentuale di reazioni positive molto maggiore che non quello di Wassermann, ma viceversa possono avere tutti i difetti, inerenti ad una sì alta titolazione e di cui sopra si è parlato.

Cioè vi sono sieri non sifilitici che risultano addirittura positivi o danno almeno una inibizione dubbia; la prova di controllo dell'antigeno non di rado non riesce; il risultato della reazione in alcuni antigeni deve essere letto subito per evitare che il potere emolitico dell'antigeno si possa esplicare (Milano).

Nell'usare degli antigeni commerciali bisogna quindi tener sempre presente il differente modo della loro titolazione, onde non incorrere in degli errori.

46552



IL POLICLINICO

PERIODICO DI MEDICINA, CHIRURGIA E IGIENE

DIRETTO DAI PROFESSORI

GUIDO BACCELLI | FRANCESCO DURANTE

DIRETTORE DELLA R. CLINICA MEDICA
DI ROMA

DIRETTORE DELLA R. CLINICA CHIRURGICA
DI ROMA

con la collaborazione di altri Clinici, Professori e Dottori Italiani e stranieri

si pubblica in tre Sezioni distinte:

Medica — Chirurgica — Pratica

IL POLICLINICO

chirurgia e dell'igiene.

nella sua parte originale (Archivi) pubblica i lavori dei più distinti clinici e cultori delle scienze mediche, riccamente illustrati, sicchè i lettori vi troveranno il riflesso di tutta l'attività italiana nel campo della medicina, della

LA SEZIONE PRATICA

che per se stessa costituisce un periodico completo, contiene lavori originali d'indole pratica, note di medicina scientifica, note preventive e tiene i lettori al corrente di tutto il movimento delle scienze mediche in Italia e all'estero. Pubblica perciò numerose e accurate riviste su ogni ramo delle scienze suddette, occupandosi soprattutto di ciò che riguarda l'applicazione pratica. Tali riviste sono fatte da valenti specialisti.

Pubblica brevi ma sufficienti relazioni delle sedute di Accademie, Società e Congressi di Medicina, e di quanto si viene operando nei principali centri scientifici, speciali corrispondenze.

Non trascura di tenere informati i lettori delle scoperte ed applicazioni nuove, dei rimedi nuovi e nuovi metodi di cura, dei nuovi strumenti, ecc., ecc. Contiene anche un ricettario con le migliori e più recenti formule.

Pubblica articoli e quadri statistici intorno alla mortalità e alle malattie contagiose nelle principali città d'Italia, e dà notizie esatte sulle condizioni e sull'andamento dei principali ospedali.

Pubblica le disposizioni sanitarie emanate dal Ministero dell'Interno, potendo esserne informato immediatamente, e una scelta e accurata Giurisprudenza riguardante l'esercizio professionale.

Pubblica in una parte speciale tutte le notizie che possono interessare il ceto medico: Promozioni, Nomine, Concorsi, Esami, Condotte vacanti, ecc.

Tiene corrispondenza con tutti quegli abbonati che si rivolgeranno al *Policlinico* per questioni d'interesse scientifico, pratico e professionale.

A questo scopo dedica due rubriche speciali e fornisce tutte quelle informazioni e notizie che gli verranno richieste.

IL POLICLINICO contiene ogni volta accurate recensioni bibliografiche, e un indice di bibliografia medica, col titolo dei libri editi recentemente in Italia e fuori, e delle monografie contenute nei Bollettini delle Accademie e nei più accreditati periodici italiani ed esteri.

A questo proposito si invitano gli autori a mandare copia delle opere e delle monografie da loro pubblicate.

LE TRE SEZIONI DEL POLICLINICO

adunque, per gli importanti lavori originali, per le copiose e svariate riviste, per le numerose rubriche d'interesse pratico e professionale, sono i giornali di medicina e chirurgia più completi possibili e meglio rispondenti alle esigenze dei tempi moderni.

ABBONAMENTI ANNUI:

	Italia	Unione postale	ESTERO
1. Alla sezione medica e alla sezione pratica . . . l.	17	25	35
2. Alla sezione chirurgica e alla sezione pratica . . .	17	25	35
3. Alle tre sezioni insieme	22	32	45
4. Alla sola sezione pratica (settimanale)	12	17	25

Un num. separato della sezione medica o chirurgica Lire UNA

Un num. separato della sezione pratica cent. 60.

Il *Policlinico* si pubblica sei volte il mese.

La sezione medica e la sezione chirurgica si pubblicano ciascuna in fascicoli mensili illustrati di 48 pagine, che in fine d'anno formano due distinti volumi, con copertina di 16 pagine.

La sezione pratica si pubblica una volta la settimana in fascicoli di 36 e di 40 pagine con copertina di 20-28 pagine.



Gli abbonamenti cominciano a decorrere dal primo di gennaio di ogni anno.