



ISTITUTO « CARLO FORLANINI »
CLINICA FISIOLÓGICA DELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA
DIRETTORE: PROF. E. MORELLI

H. HILLESHEIM, M. NUTI, G. SPINA

**PRODUZIONE DI EMOLISINE ANTIBUE
IN ANIMALI VACCINATI CON LIPOIDI TUBERCOLARI**

Estratto da ANNALI DELL'ISTITUTO « CARLO FORLANINI »
Anno III, N. 11-12, Pag. 838-844



ROMA
TIPOGRAFIA OPERAIA ROMANA
Via Emilio Moroani, 17

1939-XVIII





PRODUZIONE DI EMOLISINE ANTIBUE
IN ANIMALI VACCINATI CON LIPOIDI TUBERCOLARI

HANNS HILLESHEIM,
MASSIMO NUTI, GIUSEPPE SPINA (*)

Da parte di diversi AA. è stato osservato sia dal lato clinico che da quello sperimentale, che l'associazione di due infezioni è capace di produrre delle modificazioni nel decorso delle rispettive malattie esaltando o diminuendo la gravità dell'una o dell'altra.

SCHIAVONE (1) ha rilevato, in casi di tosse convulsa, che una vaccinazione (ad esito positivo) antiavaiolosa può influire beneficamente sugli accessi di tosse e talora farli cessare del tutto.

Dal lato sperimentale CRUVEILHIER, NICOLAU, KOPCIEWSKA (2), hanno osservato che la vaccinazione antirabica esercita una influenza attivante sulla produzione di anticorpi microbici non specifici come ad esempio verso il bacillo del tifo.

NAKADO e ARIFIKTU (3) hanno costantemente rilevato in modo più o meno evidente una resistenza, verso l'infezione tifosa, delle cavie vaccinate precedentemente con colture uccise di pneumococco, di b. dissenterico, peptoso ecc.

Tale particolare forma di resistenza o comunque di modificata recettività di fronte ad una data infezione quando a questa se ne associ un'altra di diversa natura, nota con il nome di immunità paraspecifica, è stata ampiamente ricercata e studiata nel campo tubercolare con indagini clinico-sperimentali. NINNI e DE SANCTIS MONALDI (4) hanno osservato che gli animali vaccinati con B.C.G. non solo sono protetti contro l'infezione tubercolare, ma anche contro l'infezione del b. Bang e presentano inoltre una maggiore resistenza verso la batteriemia carbonchiosa.

ASCOLI e la sua scuola (SETTI, BAREGGI, VAGHI, CREMONESI, ecc.) (5) hanno notato lo stesso fatto non soltanto verso l'infezione carbonchiosa ma anche verso l'afte epizootica.

CALMETTE e SAENZ (6) hanno dimostrato clinicamente e sperimentalmente che gli animali vaccinati con B.C.G. per varie vie presentano nel giro di 4-5 settimane non soltanto una resistenza specifica contro l'infezione da b. K. ma anche contro l'infezione da altri germi come lo streptococco, il pneumococco il b. Bang, ecc. Gli AA. spiegano in tale modo la resistenza evidente che i soggetti vaccinati nell'infanzia con B.C.G. mostrano verso alcune malattie.

(*) Il dott. Spina ha collaborato allo svolgimento del lavoro e lo ha redatto.

SARNOWIEC (7) che ha studiato lungamente sia in vivo che in vitro il comportamento dell'associazione del b. Bang con il B.C.G. e con il b. K. umano e bovino conclude che il potere agglutinante del b. Bang in presenza del b. k. umano o bovino sia in vitro che in vivo è superiore rispetto ai controlli; che il valore agglutinante del siero di cavie vaccinate con b. Bang modificato per contatto con b. K. è maggiore e questo stesso bacillo modificato è più virulento per la cavia: il fatto è particolarmente evidente se l'associazione del b. Bang avviene con il b. K. tipo bovino.

Similmente è stato da numerosi AA. (SEGA, FICI, SCOLARI, DE ANTONI, ANGLADA, CRITIEN, ecc.) rilevata la presenza nel siero dei tubercolosi di agglutinine antibruce. BESTA (8) nel nostro Istituto si è interessato dell'argomento ed ha notato sovente una agglutinazione della br. Bang di fronte a sieri di tubercolosi, osservando che non tutti i sieri di tubercolosi si comportano ugualmente con tutti i ceppi e che non esiste alcun rapporto fra il potere agglutinante del siero da un lato e la forma clinica e la gravità della malattia tubercolare dall'altro. BRUGIA (9) ottiene risultati positivi al 100 %.

KRENKER (10) fin dal 1909 ha notato nel 61 % dei tubercolosi la presenza di agglutinine contro il b. tifico. MADGWICK e PARTENER (11) nel 34 % dei tubercolosi e DAMON (12) nel 38 %.

Recentemente CRIMM e SHORT (13) hanno anche essi riscontrato la presenza di agglutinine per il tifo nei sieri di tubercolosi, in confronto con i sani, e citano che HEIDELBERGER e MENZEL (14) in un minuzioso studio sul b. tubercolare hanno notata la presenza di comuni frazioni agglutinogene con il tifo.

Similmente nel campo della immunità paraspecifica della tubercolosi rientra la maggiore produzione di anticorpi emolitici che si ha negli animali tubercolosi trattati con globuli rossi di bue in confronto dei controlli.

VANNI (15) vaccinando conigli in parte con anatubercolina PETRAGNANI ed in parte con bacilli tubercolari vivi ed inoculando successivamente globuli rossi di bue ha ottenuto sieri emolitici a titolo più elevato che negli animali controllo.

ANDREI (16) inoculando globuli rossi di montone per via intraperitoneale ha studiato la produzione di emolisine in cavie vaccinate con bacilli tubercolari vivi e morti, ed ha notato anche egli una elevata produzione di anticorpi emolitici.

NASTA e WEIMBERG (17) partendo dall'osservazione che nei neonati vaccinati con B.C.G. la mortalità per cause infettive è diminuita, e riferendo il fatto ad una presumibile aumentata facoltà di quei soggetti a produrre anticorpi, hanno voluto vedere se tale fenomeno si avesse anche in animali vaccinati con B.C.G. trattati con altri antigeni. Per quanto riguarda la produzione di emolisine, hanno infettato dei conigli con B.C.G., e dopo un mese hanno inoculato (non è specificata la via) per tre volte ed a tre giorni di intervallo cc. 1, cc. 2, cc. 2 di globuli rossi di montone: eseguita la titolazione del siero dopo otto giorni dall'ultima iniezione hanno ottenuto titoli elevatissimi di emolisine rispetto ad animali controlli.

DOLD e GROSS (18) vaccinando ogni quattro giorni con dosi crescenti (fino a 5 cc.) di globuli rossi lavati di montone dei conigli infettati da sei settimane con b. K. bovino, non hanno potuto confermare le ricerche degli altri AA. poichè i sieri ottenuti avevano titolo emolitico non superiore a quello dei sieri degli animali controllo.

In possesso di alcune frazioni lipoidee del bacillo tubercolare ci è sem'brato opportuno ricercare se queste frazioni prese singolarmente possedessero e rispettivamente in quale misura, la facoltà di aumentare la produzione di anticorpi stimolata da altri antigeni.

TECNICA.

Abbiamo adoperato frazioni lipoidee estratte da un ceppo bovino Vallée, coltivato su terreno di Sauton nel nostro Istituto, ed isolate da CATTANEO. Non essendo le sostanze solubili in acqua abbiamo dovuto prepararle convenientemente. Pesate le varie frazioni secondo il quantitativo necessario abbiamo sciolto, in bagno maria caldo, i fosfatiti (f.) e le cere (c.) in una miscela di alcool etere, a parti eguali, nella proporzione di circa due cc. di miscela per ogni 20 mngr. di sostanza; i lipoidi acetone solubili (l.a.s.) sono stati invece sciolti a caldo, nelle stesse proporzioni, in acetone. Si ottengono in tale modo. soluzioni limpide e incolori per quanto riguarda i f. e le c. colorate in giallo scuro per i l.a.s. Non potendo inoculare queste soluzioni tal quali negli animali, abbiamo proceduto nel seguente modo: riscaldata a parte a bagno maria della soluzione fisiologica la abbiamo aggiunta goccia a goccia alla soluzione precedentemente ottenuta, sempre agitando la provetta e sempre tenendo a caldo: procedendo in tale modo, lentamente si riesce ad aggiungere la sol. fisiologica nella proporzione voluta e ad ottenere una buona dispersione delle sostanze: durante l'aggiunta della sol. fisiologica le soluzioni si intorbidano divenendo lattescenti (f. e c.) e gialla scura torbida (l.s.a.). Durante l'operazione gran parte dell'alcool etere e acetone evaporano: per completare questa evaporazione si lascia la provetta aperta in bagno maria caldo o meglio si pone la sospensione nel coperchio di una capsula Petri poggiato sopra un recipiente caldo (50° C.) e si lascia un 15-20 minuti primi. Procedendo in tale modo si ottengono delle buone dispersioni delle frazioni lipoidee in sol. fisiol. che possono facilmente essere usate per l'inoculazione nell'animale.

I globuli rossi di bue usati per la produzione di emolisine erano freschi defibrinati e ripetutamente lavati e sospesi in soluzione fisiologica (ana parti).

Come animale da esperimento abbiamo adoperato conigli di peso variabile da Kg. 2 a Kg. 2,500: via di inoculazione l'endovenosa. Sia le frazioni lipoidee che i globuli rossi di bue sono stati inoculati contemporaneamente e l'intervallo fra una iniezione e l'altra è stato di quattro giorni: in totale 5 iniezioni. Gli animali sono stati sacrificati 8 giorni dopo l'ultima iniezione per salasso della carotide.

Per controllo vaccinammo un gruppo di conigli solamente con globuli rossi di bue ed un altro con globuli rossi di bue e bacilli Vallée uccisi col calore. Nella tabella a pagina seguente riporto le dosi inoculate.

Per ogni gruppo abbiamo trattato complessivamente in due turni 16 conigli: in totale 80 animali. Si è verificata nel corso del trattamento una elevata mortalità dovuta spesso ad embolia poichè le sostanze lipoidee iniettate riuscivano irritanti per la parete vasale e provocavano la formazione di trombi che nelle iniezioni successive potevano venire spinte in circolo. Un certo numero di animali è deceduto per pasteurellosi. In totale la vaccinazione è stata condotta a termine per 39 conigli così divisi: gruppo fosfatidi 8, gruppo cere 8, gruppo lipoidi acetone solubili 12, 1° controllo 5, 2° controllo 6.

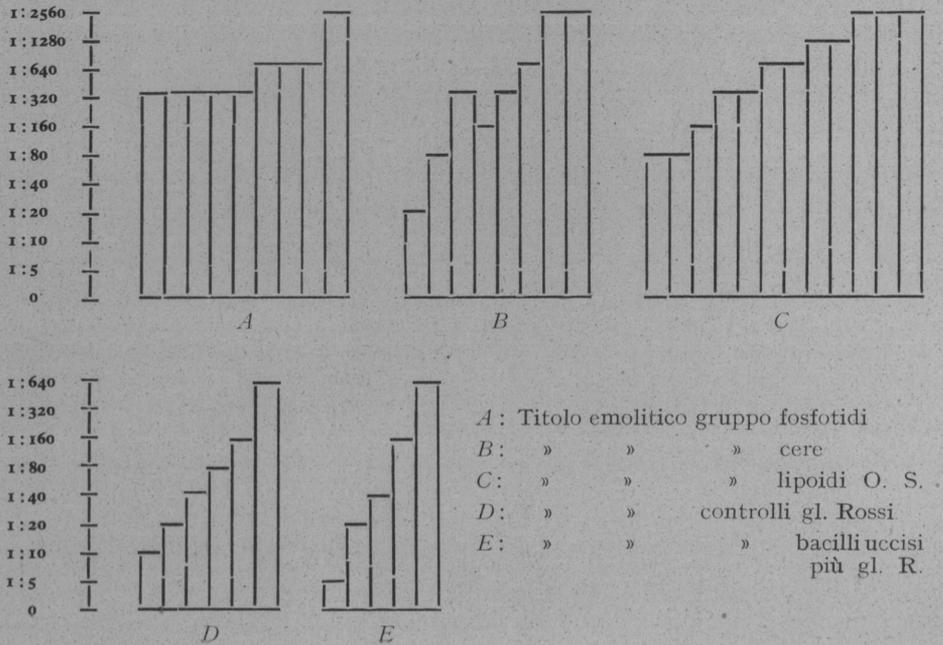
Prima della vaccinazione in tutti gli animali fu titolato l'eventuale potere emolitico del siero inattivo rispetto ai globuli rossi di bue ed alla fine del trattamento ripetemmo la titolazione delle emolisine. In ambedue le prove usammo le seguenti diluizioni: 1:5, 1:10, 1:20 e così di seguito sempre raddoppiando la diluizione fino a 1:5120.

Prima del trattamento in tutti gli animali si aveva assenza assoluta di emolisine antibue.

Dosi inoculate.

Giorno trattamento	Gruppo fosfati di	Gruppo L. A. S.	Gruppo Cere	Controllo bacilli tubercolosi uccisi	Controllo gl. Rossi bue 50%
8-7-38	5 mmgr. fosf. + 1 cc. gl. R. 50%	5 mmgr. L.A.S. + 1 cc. gl. R. 50%	5 mmgr. cere + 1 cc. gl. R. 50%	5 mmgr. bacilli uccisi, + 2 cc. gl. R. 50%	1 cc.
12-7-38	10 mmgr. fosf. + 2 cc. gl. R. 50%	10 mmgr. L.A.S. + 2 cc. gl. R. 50%	10 mmgr. cere + 2 cc. gl. R. 50%	10 mmgr. bacilli uccisi, + 2 cc. gl. R. 50%	2 cc.
16-7-38	idem	idem	idem	idem	2 cc.
20-7-38	20 mmgr. fosf. + 2 cc. gl. R. 50%	20 mmgr. L.A.S. + 2 cc. gl. R. 50%	20 mmgr. cere + 2 cc. gl. R. 50%	20 mmgr. bacilli uccisi, + 2 cc. gl. R. 50%	2 cc.
24-7-38	20 mmgr. fosf. + 4 cc. gl. R. 50%	20 mmgr. L.A.S. + 4 cc. gl. R. 50%	20 mmgr. cere + 4 cc. gl. R. 50%	20 mmgr. bacilli uccisi, + 4 cc. gl. R. 50%	4 cc.

I risultati ottenuti dopo la vaccinazione sono esposti negli schemi seguenti. Ogni rettangolino, che rappresenta il siero di un coniglio, è innalzato fino al titolo emolitico cui è giunto, titolo che è segnato sulla ascissa.



DISCUSSIONE.

Gli animali vaccinati con l.a.s. e gl. rossi di bue sono stati quelli che, proporzionalmente, hanno fornito il titolo più elevato di anticorpi emolitici (a.e.), seguiti dal gruppo trattati con f. e poi da quello con cere. Nei confronti dei controlli gli animali vaccinati con le frazioni lipoidee hanno fornito titoli nettamente superiori anche a quelli dei conigli trattati con bacilli uccisi e gl. rossi di bue. Questi ultimi animali hanno fornito titoli emolitici particolarmente bassi anche nei confronti di quelli trattati con soli gl. rossi: per quanto il numero dei controlli che hanno vissuto fino alla fine della vaccinazione sia scarso, purtuttavia la differenza nella capacità produttiva di a.e. di fronte agli animali trattati con le frazioni lipoidee è evidentissima.

Dare una spiegazione dei fenomeni osservati non è cosa facile, particolarmente per la maggiore produzione di anticorpi emolitici negli animali trattati con l.a.s. e c. più globuli rossi di bue. Per quanto riguarda i fosfatidi, infatti, è noto che essi sono capaci di produrre nei tessuti uno stimolo con carattere di specificità tubercolare. SABIN, DOAN e FORKNER (19) iniettando f. nel peritoneo hanno notato la formazione di un tessuto di tipo nettamente tubercolare; OMODEI-ZORINI e DADDI (20) mediante l'iniezione endovenosa di sospensione di fosfatidi riuscirono a provocare una disseminazione polmonare di tubercoli a sede perivascolare tale da richiamare il quadro di una miliare iniziale. Non vi è dubbio ormai che i f. posseggono una spiccata azione irritativa specifica legata alla loro costituzione chimica ed accanto ad essa un potere antigene come fu osservato da OMODEI-ZORINI e DADDI (loco citato) e da numerosi altri AA. Per i f., dunque, l'aumento di a.e. osservato nelle iniezioni abbinate con gl. rossi può comprendersi con relativa facilità sembrando logico ammettere che una sostanza capace di produrre alterazioni anatomiche evidenti del tipo tubercolare, e di funzionare da antigene, possa, nell'animale con essa vaccinato, esercitare stimoli alla formazione di altri anticorpi aspecifici (nel caso nostro a.e.) analoghi (se non altro fino ad un certo punto) a quelli che si esplicano nell'animale tubercoloso.

Per quanto riguarda i l.a.s. e le cere non si può invocare la stessa spiegazione data per i f. essendo noto [DADDI (21)], che i lipoidi acetone solubili e le c. non hanno potere antigene e non provocano reazioni tissurali specifiche del tipo di quella già accennata per i fosfatidi: per quanto SMITHBURN (22) ammetta la proprietà di provocare la comparsa di cellule giganti pur senza giungere ad un vero e proprio tessuto di granulazione, come nel caso dei fosfatidi. Si potrebbe per queste due frazioni pensare che l'azione tossica irritativa locale ed anche generale delle sostanze iniettate predisponga l'organismo ad una più forte risposta all'iniezione di globuli rossi di bue. Si spiegherebbe così anche il più alto titolo ottenuto dagli animali trattati con la frazione l.a.s. che è la più tossica ed il relativamente basso titolo ottenuto negli animali trattati con cere, che è la frazione lipoidea meno tossica.

E infine da notare che negli animali vaccinati con bacilli tubercolari uccisi più globuli rossi di bue si è avuta la produzione di un basso titolo emolitico. Ciò, che è apparentemente in contrasto con quanto ha osservato VANNI vaccinando gli animali con bacilli uccisi (anatubercolina Petraghani), è una conferma di più dell'altissimo potere antigene dell'anatubercolina stessa.

RIASSUNTO

Allo scopo di portare un contributo allo studio dell'immunità paraspecifica nella tubercolosi, gli AA. hanno ricercato la produzione di anticorpi emolitici in conigli trattati con iniezioni abbinate di frazioni lipoidee del

bacillo tubercolare bovino Vallée (fosfatidi, lipoidi, acetone, solubili, cere) e globuli rossi di bue, constatando come la produzione in questi animali di anticorpi emolitici fosse assai più elevata che nei controlli. Particolarmente elevato è stato il titolo dei sieri ottenuti dagli animali trattati con la frazione lipoide acetone solubile.

RÉSUMÉ

Dans le but d'apporter une contribution à l'étude de l'immunité parasécifique dans la tuberculose, les AA., ont recherché la production des anticorps emolytiques dans les lapins traités par des injections combinées de fractions lipéidiennes du bacille tuberculeux bovin Vallée (phosphatides, lipéides, acetone solubles, cire) et globules rouges de boeuf, constatant comme la production dans ces animaux des anticorps emolytiques est assez moins élevée que dans les contrôles. Particulièrement élevé a été le titre des sérums obtenus des animaux traités avec la fraction lipoide acetone soluble.

ZUSAMMENFASSUNG

Um einen Beitrag zum Studium der paraspezifischen Immunität der Tuberkulose zu liefern untersuchten Verf. die Produktion hämolytischer Antikörper in Kaninchen denen Iniektionen von Lipoidfraktionen des bovinen Tuberkelbazillus Vallée (Phosphatiden, acetonlösliche Lipiden, Wachse) gepaart mit roten Blutkörperchen des Ochsen verabreicht wurden. Sie stellten fest, dass die Produktion hämolytischer Antikörper dieser Tiere viel höher sei als diejenige der Kontrolltiere. Besonders hoch war der Wert der Seren die von den mit acetonlöslichen Lipoidfraktionen behandelten Tieren stammten.

SUMMARY

In order to contribute to the study of paraspecific immunity in tuberculosis, the authors have observed the productions of hemolytic antibodies in rabbits treated with combined injections of lipid fractions of the Vallée bovine tb. bacillus (phosphatides, soluble acetone lipoids, wax) and bovine red globules, ascertaining that the production of hemolytic antibodies in these animals is much greater than in the controls. The amount of serum obtained from animals treated with soluble acetone lipoids was particularly high.

RESUMEN

Con la finalidad de aportar un contributo al estudio de la inmunidad paraespecifica en la tuberculosis, los autores han investigado la producción de anticuerpos hemoliticos en conejos tratados con inyecciones combinado de procciones lipoideas del bacilo tuberculoso Vallée (fosfatidos, lipoides, acetonicas soluble, ceras) y globulos rojos de buey, constatando como la producción en estos animales de anticuerpos hemoliticos fuese mucho más elevada que en los controles. Particularmente elevado ha sido el titulo de los sueros obtenidos de los animales tratados con la fracciones lipoideas acetonas soluble.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SCHIAVONI. — « La settimana medica », n. 49, 1930.
- (2) CRUVEILHIER, NICOLAU, KOPCIEWSKA. — « Comp. Rend. », Soc. Biol., 106, pagina 212, 1931.
- (3) NAKADO e ARIFIKTU. — « Zeitsch. Immunitätforsch. », 70, pag. 1, marzo 1931.
- (4) NINNI e DE SANTIS MONALDI. — « Compt. rend. », Soc. Biol., 1901, pag. 1, 1932;
ID. — « Compt. rend. », Soc. Biol. 107, pag. 1247, 1931.
- (5) ASCOLI. — « Bioc. e Terap. Sper. », 30 sett. 1931.
- (6) CALMETTE e SANZ. — « Ann. Ist. Past. », T. IV, pag. 433, 1933.
- (7) SARNOWIEC. — « Comp. Rend. », Soc. Biol. 120, pag. 1053, 1935; ID. — « Ann. Inst. Past. », 55, 175-181, 1935.
- (8) BESTA. — « Atti conv. scient. sez. Laz. lotta contro Tbc. », marzo 1933.
- (9) BRUGIA. — « Pensiero medico », 1924.
- (10) KRENKER. — « Münch. med. Wschr », LVI, 1016, 1909.
- (11) MADGWICH e SORTNER. — « Lancet », 1: 1091-1092, maggio 21, 1932.
- (12) DAMON. — « Ann. j. Hugg. », 26, 40-45, luglio 1937.
- (13) CRIMM e SHORT. — « Tubercul. » 19, 491, agosto 1938.
- (14) HEIDELBERGER e MENZEL. — « Trans. nat. Ass. Tuberc. », 154, 1935.
- (15) VANNI. — « Boll. Ist. Sier. Mil. », ottobre 1931.
- (16) ANDREI. — « Giorn. Batt. Immun. », n. 12, 1926.
- (17) NASTA e WEIMBERG. — « Soc. de Biol. », pag. 992, 1931.
- (18) DOLD e GROSS. — « Zentralblatt. f. Bakter. », n. 104, pag. 343.
- (19) SABIN, DOAN e FORKNER. — « J. Exper. med. », v. 52, suppl. 3, 1930.
- (20) OMODEI-ZORINI e DADDI. — « Atti XXXIX Congr. Soc. Ist. Med. Int. », Pavia, 1933;
« Lotta contro Tbc. », a. V, 1181, 1934 e ibid. a. VI, 27, 1935.
- (21) DADDI. — « V Congr. Naz. Contro Tbc. » Roma, novembre 1935.
- (22) SMITHBURN. — « Ztrbl. Bakt. Ref. », B, 112, 257, 1933.

58773



~~334704~~

