92

Dott. PAOLO ALESSANDRINI

Contributo allo studio dei rapporti tra il contenuto in lipoidi del siero e reazione del Wassermann.

Estratto dal Policlinico, *Vol. XVIII-M., 1911*

80
B
14

ROMA
Amministrazione del Giornale "Il Policlinico"
N. 46 - Via del Tritone - N. 46
1911

Dott. PAOLO ALESSANDRINI

Contributo allo studio dei rapporti tra il contenuto in lipoidi del siero e reazione del Wassermann.

Estratto dal Policlinico, Vol. XVIII-II, 1911

ROMA
Amministrazione del Giornale "Il Policlinico"
N. 46 - Via del Tritone - N. 46
1911

II Clinica Medica dell'Università di Berlino
diretta dal Prof. F. Kraus

Contributo allo studio dei rapporti tra il contenuto in lipoidi del siero e reazione del Wassermann

per il dott. PAOLO ALESSANDRINI.

Le ipotesi sulla natura fisico-chimica dei processi intimi che si svolgono nella reazione del Wassermann sorsero fin da quando si vide che all'estratto acquoso del fegato sifilitico si poteva sostituire non solo l'estratto alcoolico di questo, ma anche del cuore di cavia. La sostanza che avrebbe la parte fondamentale nella reazione sarebbe così un *lipoide*. Le ricerche ulteriori tentarono d'identificare ancora meglio questa sostanza, che non sarebbe altro che lecitina giacchè, come dimostrò il Porges, la lecitina del commercio per lo più nella reazione di Wassermann può sostituire l'antigene sifilitico; siccome però, come ha messo in rilievo il Bang, la lecitina del commercio è per lo più una miscela di varie sostanze appartenenti al gruppo dei lipoidi, si comprendono i risultati delle ricerche di Sachs ed Altmann che poterono sostituire l'estratto di fegato sifilitico con oleato di sodio, del Levaditi e Yamonouchi, che ottennero gli stessi risultati con glicosaurocolato di sodio, del Fleischmann con vasellina. Tutte queste ricerche concordano in un fatto di fondamentale importanza teoretica: che cioè la reazione di Wassermann non è una reazione specifica, vale a dire che il virus sifilitico non entra direttamente nella reazione. Ciò non toglie valore minimamente al suo significato diagnostico, come si volle dapprima credere, giacchè le statistiche dimostrano luminosamente la costanza tra la reazione positiva e la presenza di manifestazioni luetiche in atto o di affezione latente e la reazione negativa e l'assenza dell'affezione. Non entra nel nostro tema il discutere qui le eccezioni apparenti o reali in questa corrispondenza. In ogni caso, ammesso che l'azione dei lipoidi si possa identificare con quella dell'estratto acquoso del fegato sifilitico (fatto non ancora sicuramente stabilito), la reazione di Wassermann verrebbe a dimostrare che gli acidi grassi o i fosfatidi

negli organi normali e patologici si trovano in combinazioni diverse, giacchè è stato sicuramente dimostrato che l'estratto del fegato normale non ha affatto le proprietà del luetico nella reazione. Nel fegato normale forse i lipoidi sarebbero combinati in un modo più stabile cogli elementi del tessuto, sicchè non passerebbero nell'estratto.

Senza voler entrare in discussioni teoretiche che non hanno rapporto colle mie osservazioni sperimentali, accennerò solo che le numerose ricerche di questi ultimi anni hanno dimostrato che i lipoidi in genere, e più specialmente la lecitina, hanno una grandissima importanza come fattori immunitarii. Il meccanismo con cui entrano in giuoco nel processo dell'immunità è ancora molto discusso; è però universalmente riconosciuto il rapporto tra quantità di lecitina del sangue e stati infettivi o tossici. Il Petit ha fatto appunto notare che le tossine sono in grado di combinarsi a forti quantità di lecitina in rapporto direttamente proporzionale alla loro azione neurotossica. Anche il Wassermann ha dimostrato che il veleno del tetano viene legato dal tessuto nervoso. È stata da vari autori dimostrata l'avidità che ha la tossina difterica per la lecitina, infine il Calmette ha dimostrato l'avidità che hanno i bacilli tubercolari per la lecitina ed ha rilevato che nel siero dei tubercolosi circola una grande quantità di questa sostanza.

Rimaneva a stabilire il contenuto dei lipoidi del siero nei vari stadî dell'infezione sifilitica e parasifilitica. Dalle ricerche del Peritz risulta appunto un aumento dei lipoidi non solo nella sifilide ma anche (ed anzi in modo più manifesto) nelle forme parasifilitiche; in base a ciò l'autore cerca di lumeggiare in modo originale e felice il meccanismo di produzione di queste forme morbose.

Se da una parte lo studio dei rapporti quantitativi di queste sostanze tra l'individuo normale e l'individuo affetto da forme sifilitiche e parasifilitiche ha una importanza grandissima dal punto di vista teorico, la difficoltà del dosaggio di questi corpi viene a diminuirne il valore pratico.

Il metodo più adoperato è il dosaggio quantitativo del fosforo dei vari estratti, etereo, alcoolico e cloroformico: il Peritz anzi ha potuto dimostrare che il fosfatide che è in forte aumento nel siero dei luetici, tabici e paralitici passa quasi esclusivamente nell'estratto alcoolico. Si comprende che questo metodo ha un valore relativo, perchè, oltre a determinare solo il gruppo dei lipoidi che nella classificazione del Thudicum, va sotto il nome di fosfatidi, non determina i singoli elementi di questo gruppo, ma un'intiera serie di sostanze, in cui il fosforo è anche ineguálmente distribuito; così, mentre esistono dei monofosfatidi, quali ad esempio, la lecitina, la mielina, esistono anche difosfatidi, quali per es. l'amido-mielina l'amido-cefalina, ecc.

Si è cercato allora di determinare in altro modo la lecitina, che sembra il costituente che entra in special modo in giuoco come meccanismo di difesa nei processi infettivi-tossici: ed il Calmette ha proposto recentemente un mezzo basato sul potere attivante che ha la lecitina nell'emolisi per veleno del cobra. Questo formerebbe colla lecitina una combinazione, il cosidetto « lecitide », il quale ha un forte potere emolitico. In base a questo principio si potrebbero rilevare nel siero delle traccie minime di lecitina ed il Calmette è riuscito a dimostrare con ciò un forte aumento del con-

tenuto in lecitina nel siero dei tubercolosi. La determinazione avviene in base al calcolo della quantità di siero (inattivato per ½ ora a 58°) che bisogna aggiungere per avere emolisi ad un'emulsione di corpuscoli rossi di cavallo lavati, tenuti insieme ad una quantità costante di veleno del cobra, tale che da sola non determini emolisi.

Il Calmette per dare un maggior valore pratico alla reazione, senza adoperare quantità diverse di siero, ha rilevato che 0.5 cmc. di siero *d'individuo normale* aggiunto ad una emulsione di emazie di cavallo lavate (1 cmc. al 5 %) 0.5 di soluzione di veleno del cobra all'1:5000 non sono in grado di determinare emolisi, mentre la stessa quantita di siero d'individui tubercolosi in una forte percentuale sarebbe in grado di attivare un tale processo, di agire cioè da complemento.

Scopo delle mie ricerche è l'applicazione di questo metodo non solo per determinare il rapporto tra infezione luetica e paraluetica e contenuto in lecitina del siero, ma anche per studiare parallelamente il comportamento della reazione del Wassermann e l'intensità della reazione del veleno del cobra. A tale scopo era indispensabile trovare un modo per potere stabilire le varie intensità della reazione, come si fa colla reazione del Wassermann; ciò è possibile adoperando colla stessa quantità di emulsione di emazie e di veleno del cobra quantità diverse di siero. I controlli indispensabili per mettermi al sicuro da eventuali errori sono due: uno per dimostrare che il siero da solo, indipendentemente dal veleno del cobra, non determini emolisi delle emazie, ed un altro atto a dimostrare che il veleno da solo non riesce emolitico. Quando le emazie datano da alcuni giorni talora si verifica emolisi anche in tali condizioni: in tale caso ho ripetuto le esperienze con emazie fresche.

Il siero è stato inattivato per mezz'ora a 58°, secondo l'indicazione del Calmette, processo per cui verrebbero ad essere distrutti gli acidi grassi o saponi, che talora, indipendentemente dalla lecitina, possono attivare il veleno del cobra.

Senza ripetere per i singoli casi i controlli, riferisco lo schema in base al quale ho eseguito le reazioni.

Esperienza.

	Provetta				
	1	2	3	4	5
	cmc.				
Siero	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005
Soluzione di veleno del cobra 1/5000	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Emulsione di emazie di cavallo al 5 %	1	1	1	1	1
Soluzione fisiologica	Fino a 3 cmc.				

Controlli.

	Provetta					
	1	2	3	4	5	6
	cmc.					
Siero	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	..
Soluzione di veleno del cobra 1 5000	..	..	..	..	..	0.5
Emulsione di cuore di cavallo al 5 %	1	1	1	1	1	1
Soluzione fisiologica	Fino a 3 cmc.					

Le provette venivano tenute in termostato a 37° gradi per due ore e poi venivano messe in ghiacciaia, secondo le indicazioni del Calmette. Si considerava come tempo massimo della reazione 24 ore, in capo al quale tempo si scrivevano i risultati. Talora abbiamo potuto constatare dopo solo qualche ora un inizio di emolisi anche nella provetta n. 1 della serie dei controlli (sieri emolitici termostabili?), ed allora scrivevamo il risultato prima che l'emolisi progredisse ulteriormente nei tubetti della seconda serie. Costantemente abbiamo constatato nelle provette della prima serie una reazione decrescente d'intensità dalla provetta 1 alla 5: vale a dire una proporzionalità della reazione alla quantità di siero adoperato.

Le mie osservazioni si riferiscono a 52 casi, di cui 40 con reazione di Wassermann positiva, e 12 con reazione negativa Per stabilire un parallelismo tra intensità della reazione di Wassermann e reazione della lecitina, ho adoperato il seguente criterio: Quando nella serie delle provette dell'esperienza si aveva emolisi fino alla provetta n. 5, mentre nei controlli non se ne aveva affatto, o solo una traccia nella provetta n. 1, chiamavo la reazione « massima » (+ + + +); se nella prima serie si aveva emolisi fino alla quarta provetta, mentre nella seconda si verificavano le condizioni suddette, chiamavo la reazione « fortemente positiva » (+ + +); se fino alla terza, « di media intensità » (+ +); se fino alla seconda « debolmente positiva » (+); se nella provetta 1 si aveva intensa emolisi, mentre nei controlli si aveva solo traccia, parlavo di reazione « dubbia » (±); se invece la reazione mancava sia nella prima, che nella seconda serie delle provette, o si comportava ugualmente, parlavo di « reazione negativa » (—).

Riferisco ora sistematicamente i risultati delle mie ricerche raggruppandoli secondo l'intensità della reazione di Wassermann.

TABELLA N. I. — *Reazione di Wassermann* —.

			Reazione della lecitina.				Reazione della lecitina.
1.	Paziente	*N*	+	7.	Paziente	*B*	+
2.	Id.	*B*	+ + +	8.	Id.	*K*	+ +
3.	Id.	*B*	—	9.	Id.	*S*	—
4.	Id.	*K*	+ +	10.	Id.	*Z*	—
5.	Id.	*P*	+	11.	Id.	*S*	+
6.	Id.	*F*	—	12.	Id.	*R*	+ + +

Dai risultati della suesposta tabella, non si possono trarre speciali conclusioni, giacchè nei casi in cui sembra specialmente in contrasto la reazione di Wassermann colla reazione della lecitina, non si trattava di individui normali ma, per esempio, nel caso n. 2, di una grave tubercolosi, e nel caso n. 12 di una gravissima anemia perniciosa, e mentre nella prima forma già Calmette ha dimostrato la frequenza dell'aumento del contenuto in lecitina del siero del sangue, non esistono osservazioni che dimostrino come si comporta il siero a tale riguardo nei casi di anemie primitive o secondarie. Mancano anche osservazioni nei casi di nefrite (caso n. 4).

Più dimostrativi mi sembrano i reperti con reazione di Wassermann positiva.

TABELLA N. II. — *Reazione di Wassermann* +.

			Reazione della lecitina.				Reazione della lecitina.
1.	Paziente	*F*	—	6.	Paziente	*E*	+ +
2.	Id.	*M*	—	7.	Id.	*R*	+ + +
3.	Id.	*R*	+ +	8.	Id.	*B*	+ + +
4.	Id.	*A*	—	9.	Id.	*F*	—
5	Id.	*K*	+ + +	10.	Id.	*S*	—

Dalla precedente tabella risulterebbe, che tra reazione di Wassermann e reazione Calmette non esiste corrispondenza, calcolando però, con una certa approssimazione il parallelismo dei valori, possiamo affermare che discordanza esiste specialmente in tre casi (5, 7, 8). In due si trattava di una tubercolosi polmonare, ed in uno di una lues epatica. Non possiamo dire se la reazione stesse in rapporto colle malattie sunnominate; ad ogni modo i due casi di tubercolosi stanno appunto in accordo colle osservazioni del Calmette.

TABELLA N. III. — *Reazione di Wassermann* + +.

			Reazione della lecitina.				Reazione della lecitina.
1.	Paziente	*D*	—	8.	Paziente	*R*	+ +
2.	Id.	*E*	+ + +	9.	Id.	*H*	+ + + +
3.	Id.	*M*	+	10.	Id.	*W*	—
4.	Id.	*R*	+	11.	Id.	*S*	—
5.	Id.	*M*	+ + + +	12.	Id.	*P*	+
6.	Id.	*C*	—	13.	Id.	*P*	—
7.	Id.	*M*	+ + +				

In questa tabella risulta ancora più la discordanza tra le due reazioni e, nonostante calcoliamo come approssimativamente corrispondenti le reazioni + + + e le +, troviamo che la reazione della lecitina si comporta completamente diversa in sette casi (53 %). È degno di menzione il fatto, che nel caso n. 5 e n. 9, in cui la reazione era fortemente positiva, si trattava di una forma di sifilide epatica e di una cirrosi. Questo fatto è tanto più notevole, quando si consideri la parte che spetterebbe, secondo alcuni, al fegato nel metabolismo dei lipoidi.

TABELLA N. IV. — *Reazione di Wassermann* + + +.

			Reazione della lecitina.				Reazione della lecitina.
1.	Paziente	*M*	—	7.	Paziente	*R*	+
2.	Id.	*B*	+	8.	Id.	*C*	—
3.	Id.	*P*	+	9.	Id.	*V*	—
4.	Id.	*D*	—	10.	Id.	*M*	+ + +
5.	Id.	*R*	+ +	11.	Id.	*G*	—
6.	Id.	*F*	—				

Dalla suesposta tabella risulta evidentissima la mancanza di qualunque parallelismo tra le due reazioni. Su 11 casi si possono considerare solo due casi corrispondenti (circa 18 %): nel caso n. 5 si trattava di una tabe, e nel n. 10 di una irite luetica.

TABELLA N. V. — *Reazione di Wassermann* + + + +.

			Reazione della lecitina.				Reazione della lecitina.
1.	Paziente	*K*	+ + +	4.	Paziente	*H*	—
2.	Id.	*B*	—	5.	Id.	*G*	—
3.	Id.	*L*	—	6.	Id.	*K*	+

Anche più manifesto è il disaccordo tra le due reazioni, nei casi di reazione di Wassermann di massima intensità. Nell'unico paziente in cui abbiamo una reazione della lecitina abbastanza intensa, si trattava di un caso di nefrite cronica; è interessante notare questa coincidenza col *caso di nefrite* della tabella n. 1.

Dall'esame complessivo di tutti i casi con reazione di Wassermann positiva (40), calcolando col sistema del Calmette (vale a dire non graduando l' intensità della reazione), troveremmo reazione positiva in una buona percentuale (50 %); ciò conferma le ricerche del Bauer e Lehndorff e del Beyer di controllo alle esperienze del Calmette. Le nostre esperienze però, autorizzano ad una importante conclusione: *la sostanza che nel siero dei luetici determina la deviazione del complemento, non è certo la stessa che attiva il veleno del cobra nella sua azione emolitica (lecitina, secondo il Calmette).*

Anche il Peritz nelle sue ricerche, ha trovato che non vi è corrispondenza diretta tra intensità della reazione di Wassermann e contenuto in lecitina del siero, e, nonostante abbia riscontrato un forte aumento dei lipoidi nel siero d'individui affetti da forme sifilitiche e parasifilitiche, ha osservato il fatto, in apparenza paradossale, che, dopo le iniezioni di lecitina, la reazione del Wassermann, prima positiva, può diventare negativa.

Tutte queste osservazioni trovano la loro spiegazione nella teoria emessa dal Bang a proposito del meccanismo della reazione del Wassermann. Egli pensa che il lipoide non è l'anticorpo sifilitico, ma è intimamente con esso combinato; per azione dell'antigene (acido oleico ?) viene scisso il lipoide dall'anticorpo e questo si cambia col complemento.

Se l'ipotesi di Calmette (che cioè la reazione del veleno del cobra sia specifica per la lecitina) troverà ulteriore conferma, noi per mezzo di tale reazione combinata colla reazione di Wassermann, potremmo stabilire delle leggi sui rapporti tra anticorpi sifilitici e lipoidi ad essi combinati.

L'osservazione da me fatta che, quanto più è intensa la reazione del Wassermann, altrettanto è più rara la reazione del Calmette, non sarebbe in contraddizione colle considerazioni suesposte; infatti si potrebbe pensare, che quanto è maggiore la quantità degli anticorpi circolanti, altrettanto è maggiore l'affinità di questi per la lecitina, ed allora il veleno del cobra non potrebbe più combinarsi a questa sostanza per formare il « lecitide ».

Per portare un contributo alla risoluzione della questione ho fatto la seguente esperienza di controllo: invece di adoperare soluzione di veleno del cobra all' 1 : 5000 l'ho adoperato in soluzione all' 1 : 3000, avendo determinato precedentemente che anche una tale soluzione, senza aggiunta di siero, non era in grado di emolizzare le emazie di cavallo. Allora ho constatato il fatto interessante, che le reazioni, che prima erano riuscite negative, nella seconda prova erano quasi tutte più o meno intensamente positive, come risulta dalla seguente tabella.

TABELLA N. VI. — *Reazione di Wassermann* + + + +.

			Reazione del cobra all'1/5000	Reazione del cobra all'1/3000
1.	Paziente	*B*	—	+
2.	Id.	*L*	—	±
3.	Id.	*H*	—	+ + +
4.	Id.	*G*	—	—
5.	Id.	*K*	+	+ +

Ciò dimostrerebbe un antagonismo tra l'anticorpo sifilitico ed il veleno del cobra rispetto all'affinità per la lecitina; l'affinità sembrerebbe proporzionale alla concentrazione delle relative sostanze.

Lo studio accurato di questi rapporti, come pure sul valore della reazione di Calmette, è ancora in via di esame, e sarà argomento di un'ulteriore pubblicazione.

BIBLIOGRAFIA.

CALMETTE, MASSOL e GUÉRIN. *Sur les propriétés activantes des sérums d'animaux sains et d'animaux tuberculeux ou tuberculinés à l'égard du venin de cobra.* Comptes rendus de l'Acad. de Sciences, 25 mai 1903.

BAUER et LEHNDORFF. Wiener Med. Wochenschrift, 1909, p. 1615.

BANG IVAR. *Die biologische Bedeutung der Lipoidstoffe.* Ergebniss. der Inn. Mediz. und Kinderheilk., 1909.

BEYER. Münchener med. Wochensch., 1910.

PERITZ. *Zur Pathologie der Lipoide.* Zeitschr. für experimentelle Pathol. und Therapie, 1910.