

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXI.

1914

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1914

Patologia. — *Alcune ricerche quantitative sul fenomeno di sensibilizzazione batteriolitica* ⁽¹⁾. Nota di F. PORCELLI-TITONE, presentata dal Corrisp. G. GALEOTTI.

Le ricerche sui rapporti quantitativi in cui gli anticorpi si legano ai rispettivi antigeni, sono state finora eseguite sulle agglutinine batteriche e sugli ambocettori emolitici, i quali, per la speciale appariscenza del fenomeno d'emolisi, meglio si prestano a questo genere di esperimenti.

Per quanto riguarda l'assorbimento delle agglutinine batteriche, hanno speciale importanza le ricerche di Eisenberg e Volk ⁽²⁾, eseguite colle agglutinine per i batteri del tifo e del colera. Queste ricerche mostravano che anticorpi ed antigeni non si legano secondo rapporti quantitativi definiti e costanti, ma in quantità che dipendono dalle concentrazioni dell'anticorpo adoperato; ed indussero ad ammettere l'ipotesi, che l'anticorpo si ripartisca tra l'antigeno e il liquido ambiente, come una sostanza in due diversi solventi mescolati insieme. Arrhenius ⁽³⁾ infatti ha mostrato che le cifre di tali esperimenti possono accordarsi colla formula di ripartizione $A = kB^{\frac{2}{3}}$.

In seguito, ricerche simili vennero eseguite da Arrhenius ⁽⁴⁾ e da Morgenroth ⁽⁵⁾ con due specie di ambocettori emolitici; e i risultati si accordarono coll'ipotesi suddetta; ma vennero poi messi seriamente in dubbio da alcuni studi di Manwaring ⁽⁶⁾ sulle modificazioni qualitative dell'ambocettore.

Recentemente la questione è stata da me ripresa con alcuni esperimenti che si proponevano principalmente di studiare quale influenza esercitano, sul fenomeno di sensibilizzazione degli eritrociti, le variazioni quantitative di ciascuno degli elementi che partecipano al fenomeno: corpuscoli rossi, siero emolitico e soluzione fisiologica.

Per i risultati di tali esperienze rimando al mio precedente lavoro *Alcune ricerche quantitative sul fenomeno di sensibilizzazione emolitica* ⁽⁷⁾, limitandomi a dire che essi si accordano colla ipotesi della ripartizione e colla suddetta formula di Arrhenius. Benchè sia da ammettere *a priori* che le reazioni di batteriolisi e d'emolisi ubbidiscano alle medesime leggi, ho voluto tuttavia estendere le suddette ricerche quantitative anche al feno-

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nell'Istituto di patologia generale della R. Università di Napoli.

⁽²⁾ Eisenberg u. Volk, Ztschr. f. Hygiene, vol. 40, pag. 155.

⁽³⁾ Arrhenius, Immunochemie, Leipzig, 1907.

⁽⁴⁾ Id., Arb. d. kais. Gesundheitames, vol. 20, pag. 10; id., Hygica, vol. 66.

⁽⁵⁾ Morgenroth (citato da Arrhenius), Immunochemie, S. 98.

⁽⁶⁾ Manwaring, Centralbl. f. Bakt. etc. vol. 40, pag. 382; id., ibid., vol. 40, pag. 386; id., ibid., vol. 40, pag. 400.

⁽⁷⁾ Porcelli-Titone, Archivio di fisiologia (in corso di pubblicazione).

meno di sensibilizzazione batteriolitica, allo scopo di dare una più larga base sperimentale alle ipotesi sulla natura di queste reazioni immunitarie.

A tal fine ho studiato come varii la quantità di sensibilizzatrice, che si lega ad una determinata quantità di batteri, col variare della concentrazione del siero batteriolitico nel liquido ove i batteri vengono sospesi.

Pertanto, in eguali volumi di soluzione fisiologica, ove erano sospese quantità costanti di batteri, si ponevano volumi differenti di siero batteriolitico, e si determinavano poi, nel modo che sto per descrivere, le quantità di sensibilizzatrice che si legavano ai batteri.

Ho eseguito due gruppi di esperimenti, adoperando in uno un siero antitifico, e nell'altro un siero anticolerico.

Metodo e tecnica degli esperimenti.

I sieri batteriolitici mi vennero forniti dall'Istituto sieroterapico milanese. Come antigeni ho usato sospensioni batteriche in soluzione fisiologica (0,85 % di cloruro di sodio), ottenute da culture in agar di ventiquattr'ore. Allo scopo di uccidere i batteri senza ricorrere a quantità tali di antisettici da disturbare le reazioni di batteriolisi e di emolisi, le sospensioni batteriche venivano fatte a questo modo. In un centimetro cubico di soluzione fenica al 3 % veniva sospeso il materiale, ricavato da una cultura in agar. Dopo circa un'ora, vi si aggiungevano nove centimetri cubici di soluzione fisiologica; e quindi il liquido veniva filtrato attraverso carta, per allontanare i piccoli grumi di batteri, che, rendendo meno omogenea la sospensione, potevano esser causa di errore nelle prove di sensibilizzazione e di dosaggio.

Gli esperimenti vennero condotti nel modo seguente: si cominciava col determinare, mediante una serie graduale di prove, qual era la quantità minima di siero batteriolitico che, in contatto con una determinata quantità di antigene, faceva deviare completamente una data quantità di complemento.

Pertanto, quantità gradualmente diverse di siero erano tenute in contatto, a 37°.5 per un'ora, con cm.³ 0,1 della suddetta sospensione batterica e con cm.³ 0,05 di siero fresco di cavia. Il volume totale del liquido era di quattro centimetri cubici. Contemporaneamente una certa quantità di corpuscoli rossi veniva sensibilizzata con un siero emolitico noto, impiegando, per ogni unità di volume di essi, due unità emolitiche di siero.

Dopo un'ora di permanenza in termostato, si aggiungeva, in ogni prova di batteriolisi, un cm.³ della sospensione di corpuscoli rossi sensibilizzati; e le miscele erano tenute in termostato per due ore.

Dopo questo tempo, si giudicava del grado d'emolisi raggiunto in ogni tubo, provando la trasparenza del liquido. Si notava allora qual era la quantità minima di siero batteriolitico che aveva impedito completamente la emolisi, e si segnava anche la quantità massima che non l'aveva affatto ostacolata.

Dopo questo dosaggio preliminare, si eseguivano gli esperimenti di sensibilizzazione, ponendo in piccoli Erlenmeyer sterili: 1°) quantità di soluzione fisiologica tali da rendere pari in tutte le prove il volume finale del liquido; 2°) quantità uguali di antigene; 3°) quantità diverse di siero batteriolitico. Gli Erlenmeyer, ben tappati, erano tenuti in termostato per un'ora; e quindi i liquidi venivano centrifugati per mezzo d'una centrifuga elettrica a forte velocità di rotazione (circa 6000 giri al minuto). Il liquido limpido che si separava dai corpi batterici, era decantato con pipette sterili e se ne dosava il potere batteriolitico, così come s'era dosato quello del relativo siero: vedendo cioè qual era la quantità minima di esso che, messa in contatto con cm.^3 0,1 di nuova sospensione batterica, era capace di far deviare completamente, nelle condizioni già dette, la quantità di complemento contenuta in cm.^3 0,05 di siero fresco di cavia.

Contemporaneamente alla titolazione dei liquidi centrifugati, veniva ripetuta quella del siero batteriolitico. Così, impiegando, nelle diverse serie di prove da confrontare, lo stesso siero di cavia ed alla stessa distanza di tempo dal suo prelevamento dall'animale, erano evitati i possibili errori dipendenti da differenze dell'attività del complemento.

In queste prove di dosaggio, tenute in termostato per due ore, si vedeva quali erano le quantità dei diversi liquidi centrifugati e le quantità di siero che si mostravano equivalenti per il grado d'emolisi che avevano permesso; badando principalmente alle quantità minime che avevano dato completa deviazione del complemento, e alle quantità massime che non avevano ancora impedito l'emolisi completa. I tubi venivano poi tenuti in ghiacciaia per ventiquattr'ore e, man mano che l'emolisi progrediva, si pigliava nota delle nuove equivalenze che si rendevano palesi. Dai diversi rapporti tra le quantità equivalenti di ciascun liquido centrifugato e del siero, si ricavava un valore medio, che indicava, con migliore approssimazione, l'abbassamento del potere batteriolitico del siero in seguito al contatto coi corpi batterici, nella relativa prova di sensibilizzazione. Da esso, conoscendo le diluizioni e le quantità adoperate, era facile di calcolare, in volumi equivalenti di siero batteriolitico, la quantità di sensibilizzatrice che s'era legata ai batteri.

Durante tutti gli esperimenti si ebbe la massima cura d'evitare ogni causa di possibile inquinamento dei liquidi.

Esperimenti eseguiti.

I Serie.

Come ho già detto, eseguii il primo gruppo di esperimenti con un siero antitifico. Il suo potere batteriolitico era basso: infatti, usando, nelle prove di dosaggio, cm.^3 0,1 della solita sospensione batterica su 4 cm.^3 di liquido, cm.^3 0,05 di siero fresco di cavia e poi cm.^3 1 di sospensione ((all'uno su 20 di corpuscoli rossi sensibilizzati con due unità emolitiche di siero, la quan-

tità minima di siero batteriolitico capace di dare deviazione completa risultò pari a cm.^3 0,02.

Nelle prove di sensibilizzazione di batteri, in 10 cm.^3 di liquido era contenuto 1 cm.^3 della solita emulsione batterica e quantità diverse, da cm.^3 5 a cm.^3 0,5, di siero batteriolitico.

La tabella I mostra i risultati di questi esperimenti. Le quantità di sensibilizzatrice sono espresse mediante volumi equivalenti del siero batteriolitico. Nell'ultima colonna ho indicato, in frazioni decimali, il rapporto tra la quantità di sensibilizzatrice legata ai batteri e la quantità adoperata.

TABELLA I.

Sensibilizzatrice adoperata	Sensibilizzatrice rimasta nel liquido	Sensibilizzatrice legatasi ai batteri	Rapporto tra la quantità di sensibilizzatrice legata e quella adoperata
5	1.820	3.180	0.636
2.500	0.680	1.820	0.728
1	0.200	0.800	0.800
0.500	0.070	0.430	0.860

II Serie.

Questo secondo gruppo di esperimenti è stato eseguito con un siero anticolerico, a potere batteriolitico alto. In un dosaggio, fatto nelle stesse condizioni di quello del precedente siero antitifico, la dose minima capace di dare deviazione completa del complemento risultò pari a cm.^3 0.0015.

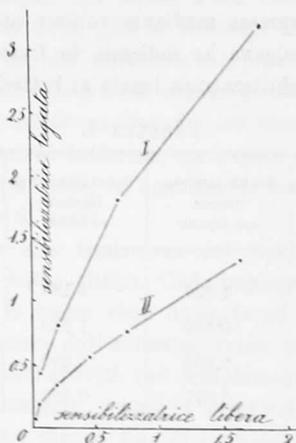
Le prove di sensibilizzazione dei batteri vennero eseguite come quelle della serie precedente, usando, su 10 cm.^3 di liquido, 1 cm.^3 di emulsione batterica e quantità diverse di siero batteriolitico: da cm.^3 3 a cm.^3 0,1.

Riferisco nella tabella II i risultati di questi esperimenti.

TABELLA II.

Sensibilizzatrice adoperata	Sensibilizzatrice rimasta nel liquido	Sensibilizzatrice legatasi ai batteri	Rapporto tra la quantità di sensibilizzatrice legata e quella adoperata
3	1.650	1.350	0.450
1.500	0.760	0.740	0.493
1	0.450	0.550	0.550
0.500	0.180	0.320	0.640
0.250	0.060	0.190	0.760
0.100	0.018	0.082	0.820

Coi dati di queste tabelle ho costruito le curve della figura, sull'ascissa le quantità di sensibilizzatrice rimaste libere, e sulle ordinate le quantità legatesi ai batteri. Siccome in tutti gli esperimenti furono impiegati volumi costanti di sospensione batterica e di soluzione fisiologica, queste curve esprimono rapporti di concentrazioni.



I risultati delle due serie di esperienze mostrano, che la quantità di sensibilizzatrice che si lega al protoplasma batterico, aumenta col crescere della quantità di siero batteriolitico adoperata; e che invece il rapporto tra la quantità di sensibilizzatrice legata e quella adoperata diminuisce col crescere di quest'ultima quantità.

Questi risultati sono simili a quelli da me ottenuti negli esperimenti citati, sull'assorbimento dell'ambocettore emolitico, e concordano quindi coi dati sperimentali di Eisenberg e Volk e con quelli di Arrhenius e Morgenroth.

Vediamo ora se ad essi è applicabile la formula di ripartizione:

$$A = kB^{\frac{2}{3}},$$

secondo la quale (essendo A la concentrazione della sensibilizzatrice nel protoplasma batterico, e B quella nel liquido ambiente), a due molecole di sensibilizzatrice libere nel liquido, ne corrisponderebbero tre legate al protoplasma dei batterii.

A tal fine, colle cifre delle due tabelle precedenti, ho calcolato i valori della costante k , che riferisco nella tabella III.

Tenuto conto dei facili errori per il metodo di dosaggio indiretto, con cui è stato necessario di eseguire gli esperimenti, questi valori possono ritenersi

come sufficientemente concordanti: e quindi è da ritenere che la suddetta formula di ripartizione valga anche per le sensibilizzatrici batteriolitiche.

TABELLA III.

VOLUMI di siero adoperati cmc.	VALORI DELLA COSTANTE	
	Per il siero antitifico	Per il siero anticolerico
5	2.15	
3		1.07
2.500	2.35	
1.500		0.89
1	2.34	0.94
0.500	2.53	1
2.250		1.24
0.100		1.19
MEDIE . . .	2.34	1.05

CONCLUSIONI.

Il fenomeno per cui la sensibilizzatrice batteriolitica si lega al protoplasma dei batteri, è quantitativamente regolato dalle stesse leggi, secondo le quali la sensibilizzatrice emolitica si fissa agli eritrociti, e l'agglutinina ai corrispondenti corpi batterici.

In tali reazioni immunitarie, anticorpo ed antigene non si legano tra loro secondo rapporti quantitativi costanti.

La quantità di anticorpo che si lega ad una data quantità di antigene, aumenta col crescere della concentrazione dell'anticorpo nel liquido ambiente.

Il rapporto tra la quantità d'anticorpo che si lega all'antigene e la sua concentrazione iniziale nel liquido, diminuisce man mano che questa concentrazione aumenta.

Tra la quantità A d'anticorpo, che si lega ad ogni unità di volume di antigene, e quella B che rimane libera in ogni unità di volume del liquido ambiente, pare che si stabilisca l'equilibrio espresso dall'equazione:

$$A = kB^{\frac{2}{3}}$$

secondo la quale a tre molecole legate corrisponderebbero due molecole libere.

Appare pertanto molto probabile l'ipotesi che l'anticorpo si ripartisca nell'antigene e nel liquido ambiente, come in due diversi solventi, ove assuma pesi molecolari diversi.