

100. V. MAZZARACCHIO, V. ZAVAGLI, Z. ORFEI, E. FONTANELLI, A. D'AMORE, L. RAVAIOLI, B. CASTAGNOLI. — **Osservazioni comparative sulle reazioni immunitarie provocate nei bovini con la inoculazione dei vaccini antiaftosi monovalenti, bivalenti e trivalenti.**

Riassunto. — Si riportano i valori immunitari riscontrati su sieri di bovini vaccinati contro l'afta con preparati monovalenti, bivalenti e trivalenti. La massima reazione anticorpale si è verificata a seguito della vaccinazione monovalente. Seguono le combinazioni vaccinali con due preparazioni monovalenti e le preparazioni bivalenti. Per ultimo si classificano indifferentemente le reazioni conseguenti alla vaccinazione con tre preparazioni monovalenti o con la combinazione trivalente.

Summary. — The immune levels found in the sera of cattle vaccinated against foot and mouth disease with mono; bi- and trivalent preparations are reported together with combinations of two monovalent and the bivalent preparations. No difference was detected in the reactions following vaccination with three monovalent preparations and the trivalent preparation.

Durante l'applicazione ormai ventennale delle vaccinazioni antiaftose sono state fatte numerose osservazioni pratiche sulla diversità della risposta immunitaria dei bovini a seguito delle vaccinazioni con preparati monovalenti e con preparati polivalenti.

Allo scopo di procurare dati sperimentali che servissero ad avvalorare le varie supposizioni avanzate, si è pensato di procedere ad una sistematica ricerca sui bovini. E' stato perciò impostato un esperimento su un numeroso gruppo di bovini adulti; l'esperimento è stato così condotto:

1) Si sono allestite le sette seguenti preparazioni vaccinali antiaftose secondo la tecnica Waldmann originale:

Vaccino monovalente tipo O

Vaccino monovalente tipo A

Vaccino monovalente tipo C

Vaccino bivalente tipo OA

Vaccino bivalente tipo OC

Vaccino bivalente tipo AC

Vaccino trivalente OAC

2) In possesso di queste preparazioni vaccinali perfettamente controllate dal punto di vista della sterilità e dell'innocuità, si sono trattati n. 33 bovini in località indenne da tempo da afta epizootica; i detti soggetti non erano mai stati sottoposti in precedenza alla vaccinazione.

3) I 33 bovini sono stati divisi negli 11 gruppi sottoelencati di 3 soggetti ciascuno ed inoculati nel sottocute della giogaia, nel modo indicato nella tabella A nella quale sono registrati anche il numero di matricola, l'età ed il sesso dei soggetti.

- 1° gruppo - con vacc. monov. tipo A
- 2° gruppo - con vacc. monov. tipo O
- 3° gruppo - con vacc. monov. tipo C
- 4° gruppo - con vacc. monov. tipo A + monov. O (inoculati in sedi distinte)
- 5° gruppo - con vacc. monov. tipo A + monov. C (inoculati in sedi distinte)
- 6° gruppo - con vacc. monov. tipo O + monov. C (inoculati in sedi distinte)
- 7° gruppo - con vacc. monov. tipo O + monov. C + monov. A (inoculati in sedi distinte)
- 8° gruppo - con vacc. bival. tipo AO (virus mescolati nella prep. del vaccino)
- 9° gruppo - con vacc. bival. tipo AC (virus mescolati nella prep. del vaccino)
- 10° gruppo - con vacc. bival. tipo OC (virus mescolati nella prep. del vaccino)
- 11° gruppo - con vacc. trival. tipo OAC (virus mescolati nella prep. del vaccino).

A tutti i bovini fu prelevato il siero prima della vaccinazione (indicato nei grafici con la voce « presiero »), quindi per 10 volte dopo la vaccinazione come riportato nella tabella A annessa.

Dopo circa otto mesi dalla vaccinazione a tutti i soggetti fu praticato il salasso e, subito dopo, essi vennero sottoposti ad una vaccinazione di richiamo, impiegando l'identica dose e le identiche modalità seguite precedentemente; dopodichè furono assoggettati al 12° ed al 13° salasso.

Riassumendo, i 33 bovini furono sottoposti ad un salasso preventivo (presiero), a due vaccinazioni, ed a 13 salassi in periodi consecutivi.

Per quanto riguarda le due vaccinazioni, taluno avrebbe potuto obiettare che i soggetti degli 11 gruppi non sarebbero stati inoculati con un quantitativo fisso di mestruo vaccinale, ma con dosi variabili. Infatti i bovini dei gruppi 1, 2 e 3 avrebbero ricevuto in totale cm^3 13 di materiale vaccinale; i bovini dei gruppi 4, 5, 6, 8, 9, 10 ne avrebbero ricevuto cm^3 30; i bovini dei gruppi 7 ed 11 ne avrebbero, infine, ricevuto cm^3 45. Da ciò potrebbe farsi l'appunto che, nella eventualità che le sostanze chimiche del mestruo vaccinale (idrossido di alluminio, soda e glicocolle) avessero il potere di agire come sostanze coadiuvanti l'immunità, la diversità delle dosi impiegate potrebbe inficiare in parte il valore dei dati raccolti.

Noi non diamo soverchio valore ad una eventuale azione delle sostanze contenute nel mestruo, nel senso adjuvante l'immunità come concepito dal Ramon; se siamo favorevoli all'impiego nella pratica, di dosi di vaccino più elevate (a parità di contenuto totale in virus) si è perchè riteniamo che una maggiore quantità di idrossido di alluminio con virus adsorbito, provochi una più lenta messa in circolo del virus e quindi una immunità, in un certo senso, più solida.

Ad ogni modo, allo scopo di non trascurare anche questo aspetto del problema, noi abbiamo provveduto ad inoculare, ad un soggetto di ogni gruppo, un quantitativo di puro mestruo vaccinale, senza virus, capace di portare la dose complessiva di materiale vaccinale inoculato, a cm^3 45, che rappresenta il massimo quantitativo inoculato nei gruppi di bovini trattati con i vaccini trivalenti e con le tre preparazioni di vaccino monovalente.

I soggetti sottoposti a questa inocolazione supplementare sono indicati nell'ultima colonna della Tabella I.

I 462 campioni di siero prelevati nei tempi sopra indicati, vennero saggiati alla prova della sieroneutralizzazione degli anticorpi, impiegando la tecnica seguente.

TITOLAZIONE DEL VIRUS.

La titolazione in vitro, eseguita su cellule renali tripsinizzate di suino, si è ottenuta facendo diluizioni scalari in ragione 10 del virus usato ed inoculando 4 tubi-coltura con cm^3 0,1 per ogni diluizione e per ogni tubo. Come diluente si è usata la soluzione di Hanks a pH 7,6. La lettura dei tubi-coltura è stata effettuata dopo 24-48-72 ore dall'inoculazione del virus. Con il calcolo di Reed e Muench si è stabilita la dose citopatica del virus (DCT_{50}).

TABELLA I

N. d'ordine dei bovini	Stalla	Sesso e matricola	Data di nascita	Preparazione vaccinale inocolata	Dose vaccinale in cm ³	Soluzione di mestruo vaccinale addizionato in cm ³
1	casermone	F. 601	2-5-56	monov.	15	—
2	casermone	F. 602	20-6-57	"	15+	30
3	tufi	M. 27	7-5-57	"	15	—
4	casermone	F. 686	1-8-56	"	15	—
5	casermone	F. 6	12-3-57	"	15+	30
6	tufi	M. 5	12-3-57	"	15	—
7	casermone	F. 603	15-3-57	"	15	—
8	tufi	M. 8	21-3-57	"	15+	30
9	tufi	M. 10	27-3-57	"	15	—
10	casermone	F. 682	20-5-56	"	15+15	—
11	casermone	F. 11	28-3-57	"	15+15+	15
12	tufi	M. 12	29-3-57	"	15+15	—
13	casermone	F. 690	5-6-56	"	15+15	—
14	casermone	F. 14	13-4-57	"	10+15+	15
15	tufi	M. 13	2-4-57	"	15+15	—
16	casermone	F. 22	27-4-57	"	15+15	—
17	casermone	F. 18	18-4-57	"	15+15	—
18	tufi	M. 15	16-4-57	"	15+15+	15
19	casermone	F. 688	9-6-56	"	15+15	—
20	casermone	F. 23	30-4-57	"	15+15+15	—
21	tufi	M. 24	30-4-57	"	15+15+15	—
22	casermone	F. 677	12-4-56	"	15+15+15	—
23	casermone	F. 3	7-3-57	bival.	30	—
24	tufi	M. 26	4-3-57	"	30+	15
25	casermone	F. 30	21-5-57	"	30	—
2	casermone	F. 29	15-5-57	"	30	—
27	tufi	M. 28	12-5-57	"	30+	15
28	casermone	F. 758	4-3-57	"	30	—
29	casermone	F. 752	17-2-57	"	30	—
30	tufi	M. 759	6-3-57	"	30+	15
31	casermone	F. 760	6-3-57	"	30	—
32	casermone	F. 756	2-3-57	trival.	45	—
33	tufi	M. 755	1-3-57	"	45	—

SIERO-NEUTRALIZZAZIONE.

La neutralizzazione con i sieri da saggiare è stata eseguita in vitro su colture di cellule tripsinizzate di rene di suino preparate secondo la tecnica usuale.

I sieri sono stati inattivati per 30' a 56°C; successivamente sono state fatte varie diluizioni dei sieri in ragione 2. Le varie diluizioni dei sieri da titolare sono state mescolate con uguali quantità di virus diluito in modo che in 0,1 cm³ fossero contenute circa 100 DCT₅₀. La miscela siero-virus è stata tenuta a temperatura ambiente (18-20°C circa) per un'ora e quindi inoculata in tubi-coltura per ciascuna diluizione nella quantità di 0,2 cm³ per tubo. Le letture dei risultati sono state eseguite dopo 1-2-3-4 giorni dalla inoculazione ed il titolo limite di neutralizzazione del siero è stato calcolato secondo il metodo di Reed e Muench.

RISULTATI

Tutti i 33 soggetti dimostrarono assenza di anticorpi al momento del salasso compiuto prima della vaccinazione (presiero).

Il successivo comportamento anticorpale nei confronti dei tre tipi di virus O-A-C (ricercato per sette combinazioni nei confronti del virus O, per 7 combinazioni nei confronti del virus A, e per 7 combinazioni per il virus C) è riportato nella Tabella II e graficamente riprodotto nelle tre figure.

A seguito dei diversi trattamenti vaccinali, tutti i 33 soggetti hanno avuto una reazione anticorpale, benchè in misura variabile; gli anticorpi prodotti sono sempre risultati strettamente tipo-specifici nel senso che ciascun tipo di virus non ha mai provocato la formazione di anticorpi di gruppo.

La reazione anticorpale di fronte alla prima vaccinazione è stata immediata dato che era già presente al 15° giorno, però per quanto riguarda il titolo anticorpale, esso non è stato molto alto; non si è superato in genere il valore di 1:16. Solamente col monovalente C si è raggiunto il valore di 1:32. L'andamento anticorpale non è stato di lunga durata, perchè tutta la curva era praticamente esaurita dopo 5 mesi circa dall'intervento.

Allorchè dopo circa 7 mesi e mezzo si è proceduto alla vaccinazione di richiamo, la maggioranza dei soggetti aveva un tenore anticorpale inferiore ad 1:4.

TABELLA II

Combinazioni vaccinali	Titoli anticorpali dei sieri prelevati nelle date:													
	24-VI-1936	Titolo anticorpale del prelesero	22-VI-38	18-VII	28-VII	11-VIII	27-VIII	10-IX	26-IX	2-X	24-IX	6-11-39	11-11	11-6
Combinazioni vaccinali O O+A O+C O+A+C OA OC OAC	< 4	< 4	8	8	16	16	16	16	16	16	4	4	16	64
	< 4	< 4	8	8	16	16	16	16	16	16	8	< 4	8	16
	< 4	< 4	8	8	16	16	16	16	16	16	8	4	8	16
	< 4	< 4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	< 4	8	16
	< 4	< 4	4	< 4	< 4	< 4	4	4	< 4	< 4	< 4	4	6	8
	< 4	< 4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	< 4	4	8
Ricerca anticorpi verso il virus A	< 4	< 4	16	16	16	16	16	16	16	16	8	< 4	16	10
	< 4	< 4	4	8	8	8	8	8	8	8	4	< 4	4	8
	< 4	< 4	16	16	16	16	16	16	16	16	8	< 4	8	4
	< 4	< 4	16	10	16	16	16	8	10	16	8	< 4	8	16
	< 4	< 4	16	16	16	16	16	16	16	16	8	< 4	8	8
	< 4	< 4	4	4	4	4	4	4	4	4	< 4	< 4	8	8
Ricerca anticorpi verso il virus C	< 4	< 4	< 4	4	8	8	8	8	8	8	4	< 4	4	4
	< 4	< 4	32	32	32	32	32	32	32	32	16	< 4	32	32
	< 4	< 4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	< 4	16	16
	< 4	< 4	16	16	16	16	16	16	16	16	16	8	10	16
	< 4	< 4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	< 4	16	16
	< 4	< 4	4	6	8	8	8	8	8	8	8	< 4	8	16
Ricerca anticorpi verso il virus CA	< 4	< 4	16	16	16	16	16	16	16	16	< 4	< 4	8	8
	< 4	< 4	16	16	16	16	16	16	16	16	< 4	< 4	8	8
	< 4	< 4	4	4	4	4	4	4	4	4	< 4	< 4	8	8
Ricerca anticorpi verso il virus CAO	< 4	< 4	4	4	4	4	4	4	4	4	< 4	< 4	4	4
	< 4	< 4	4	4	4	4	4	4	4	4	< 4	< 4	4	4
	< 4	< 4	4	4	4	4	4	4	4	4	< 4	< 4	4	4

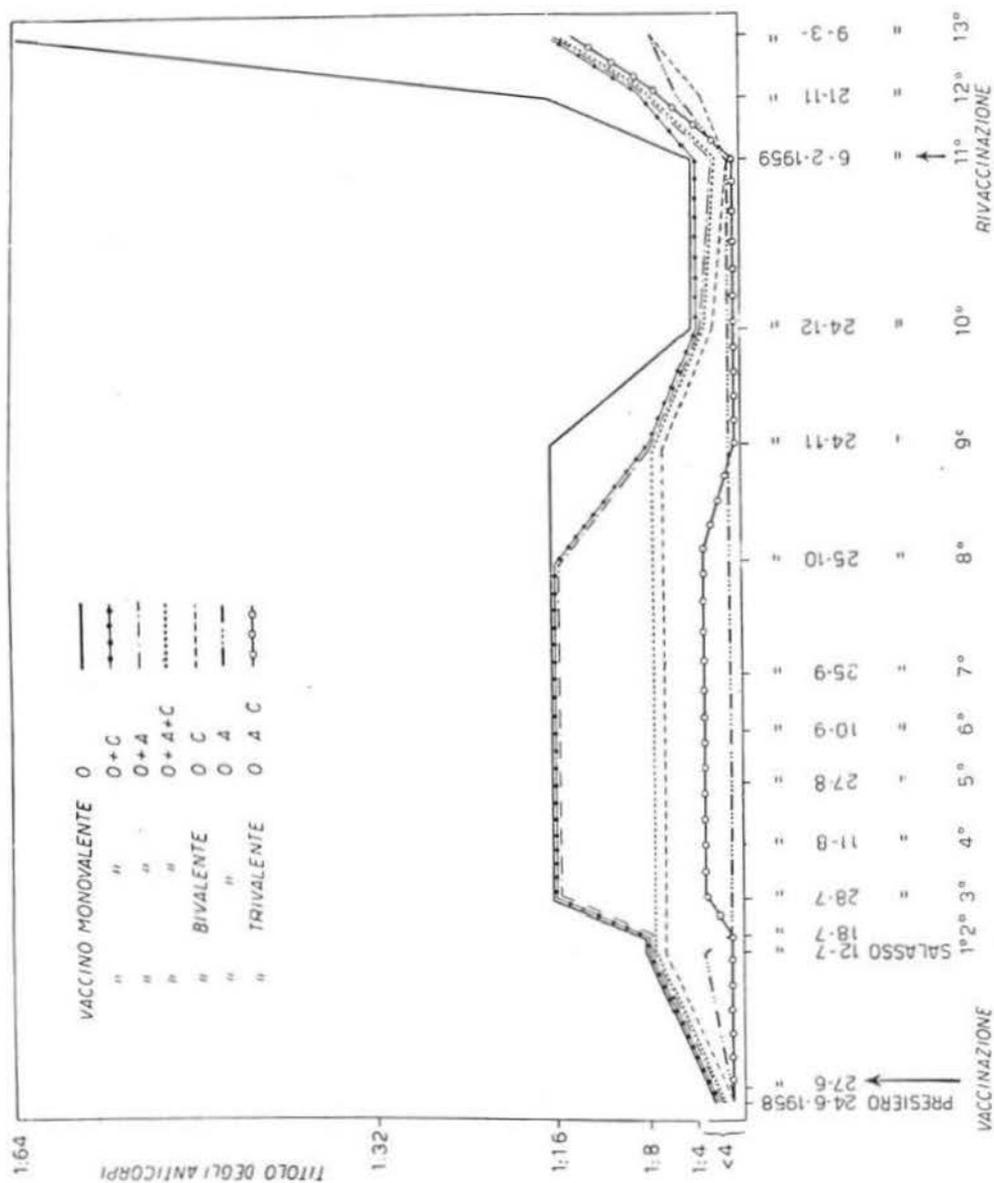


Fig. 4. - Attività degli anticorpi nei riguardi del virus tipo O.

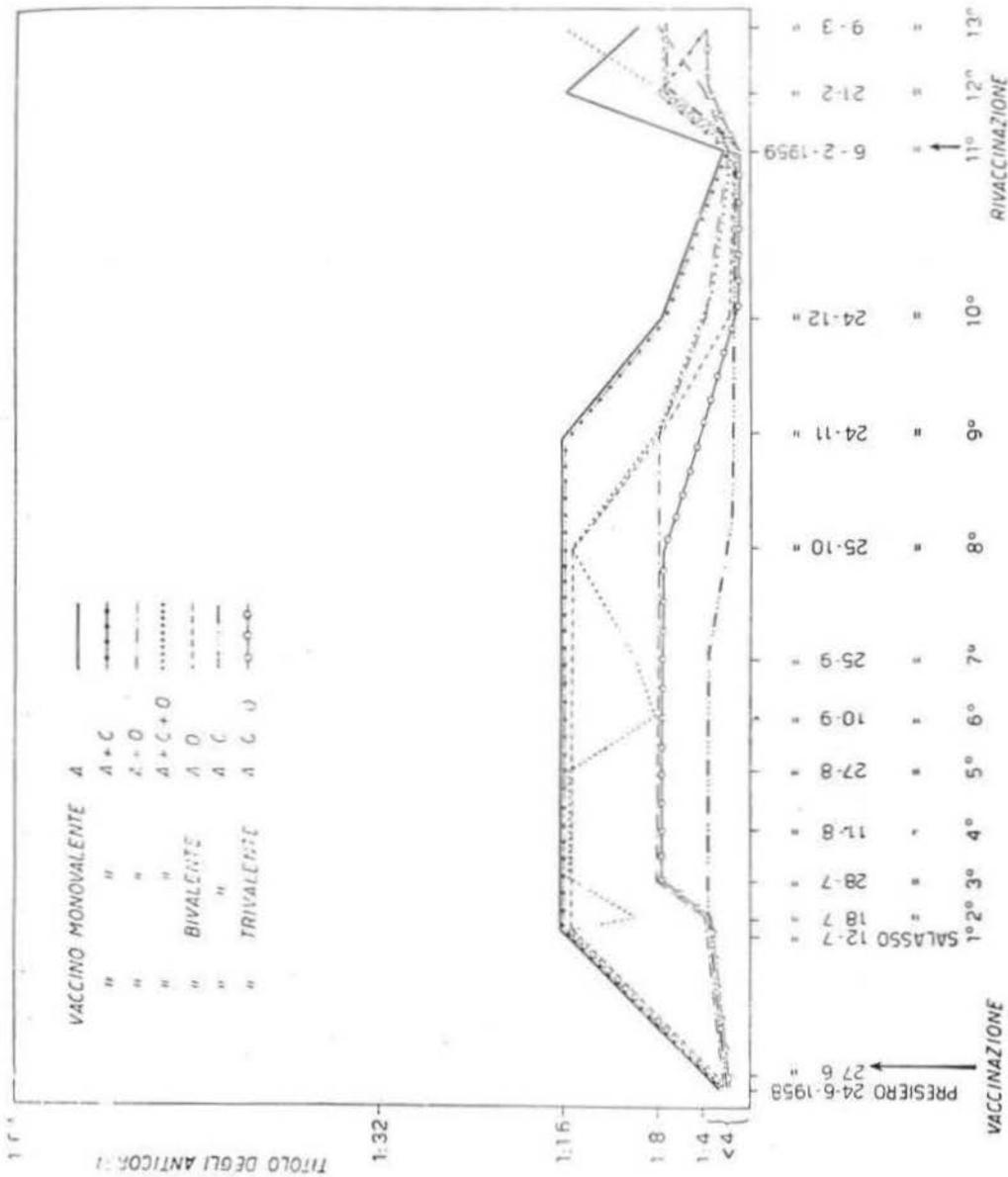


Fig. 2. - Attività degli anticorpi nei riguardi del virus tipo A.

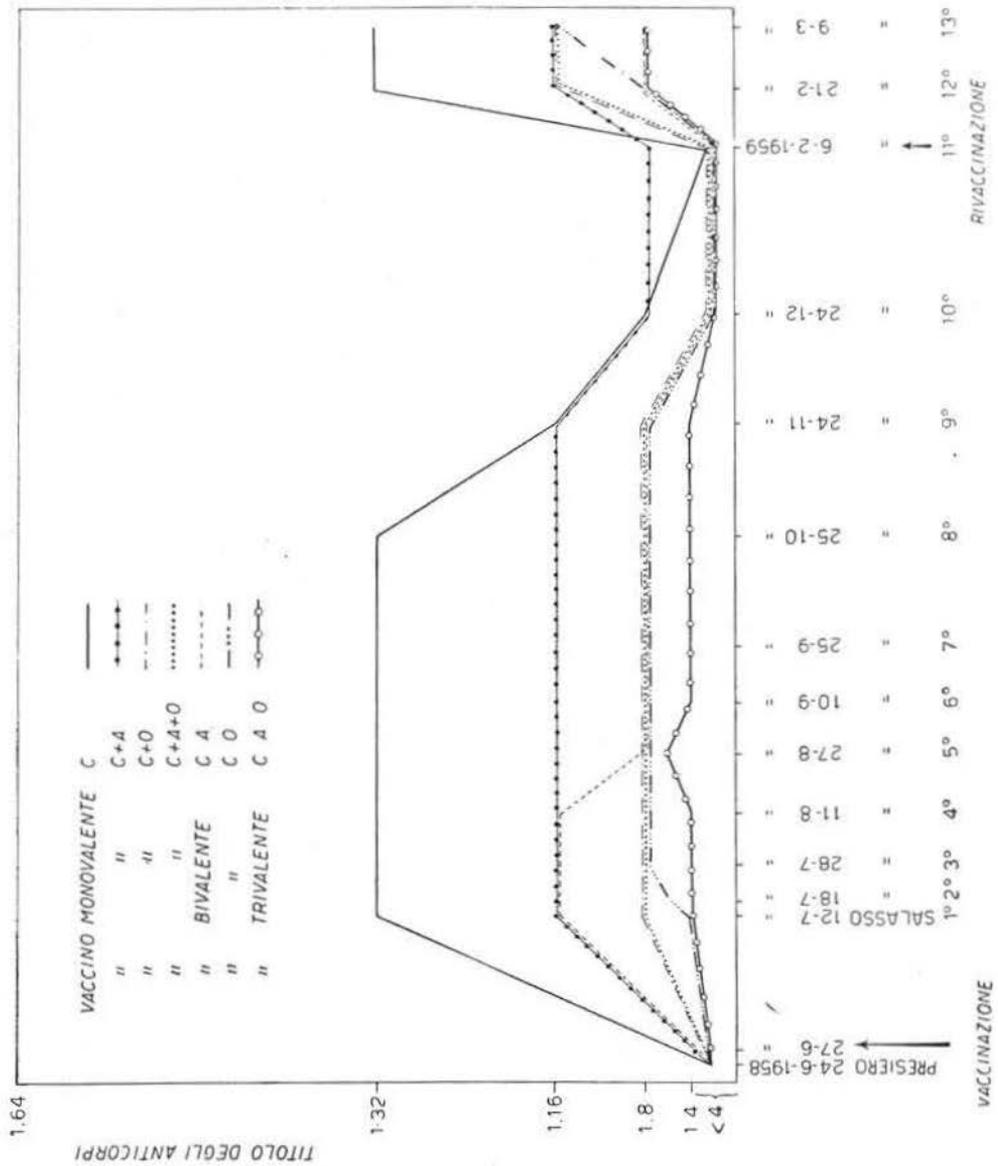


Fig. 3. - Attività degli anticorpi nei riguardi del virus tipo C.

La risposta alla iniezione di richiamo è stata pronta e netta raggiungendo i massimi, per i tre vaccini monovalenti, dal 15° al 30° giorno.

Un'osservazione interessante è stata fatta a questo riguardo, nel senso che i massimi valori raggiunti con la inoculazione di richiamo si sono in genere livellati con i massimi valori corrispondenti, consecutivi alla prima vaccinazione. Solamente il gruppo vaccinato con il monovalente O ha reagito all'inoculazione di richiamo in modo abnorme, raggiungendo il titolo di 1:64, mentre con la prima inoculazione non aveva superato 1:16.

I soggetti inoculati con il bivalente OA, con il bivalente AC, e con il trivalente CAO sono gli unici che abbiano dimostrato una reazione anticorpale molto debole nei confronti rispettivamente del virus O, del virus A, e del virus C.

Il gruppo inoculato con il trivalente ACO è l'unico che abbia risposto in maniera quasi insignificante alla inoculazione di richiamo nei confronti del virus A.

Se si passano ad esaminare i risultati relativi alle varie combinazioni vaccinali impiegate, si possono fare le seguenti osservazioni:

1) *Risposta anticorpale alle vaccinazioni con una sola preparazione monovalente.*

Nei gruppi 1-2-3 il movimento anticorpale ha raggiunto il massimo nei primi 15 giorni per quanto riguarda i virus A e C ed al 30° giorno per quanto riguarda il virus O, con valori massimi di 1:16 per i virus O ed A e di 1:32 per il virus C.

I valori si sono mantenuti stazionari fino allo scadere del 5° mese dalla vaccinazione, per ridursi sensibilmente al termine del 6° mese, e quasi completamente dopo il 7° mese, al momento della rivaccinazione.

Dopo la vaccinazione di richiamo, la reazione anticorpale dei tre virus non è stata uniforme: il virus O ha raggiunto al 15° giorno il titolo di 1:16 ed al 30° giorno di 1:64. Il virus A ha raggiunto dopo 15 giorni il titolo di 1:16, ripiegando dopo 30 giorni al titolo di 1:8. Il virus C ha raggiunto in 15 giorni il titolo di 1:32 che è restato costante anche al 30° giorno.

Come norma, si è chiaramente osservato, in tutti e tre i grafici, che la curva anticorpale provocata dal vaccino monovalente si è sempre mantenuta nettamente ad un livello più alto di quella provocata nei gruppi inoculati con le altre combinazioni.

2) *Risposta anticorpale nei bovini inoculati con due preparazioni monovalenti e con corrispondenti vaccini bivalenti.*

Nei confronti degli anticorpi O, si è visto che mentre la reazione all'inoculazione di due monovalenti è stata ottima, la reazione di due bivalenti corrispondenti è stata estremamente inferiore; per quanto riguarda il virus A la differenza di comportamento non è stata significativa; per quanto riguarda il virus C, invece, la risposta ai due vaccini monovalenti è stata più evidente di quella consecutiva ai bivalenti corrispondenti.

3) *Risposta anticorpale nei bovini inoculati con tre preparazioni monovalenti o con la corrispondente preparazione trivalente.*

Se si confrontano le reazioni dei soggetti inoculati con 3 preparazioni monovalenti, con quelle consecutive alla inoculazione del trivalente, si possono trarre i seguenti dati:

Per il virus O si è avuta una reazione molto inferiore, consecutiva al trivalente, dopo la prima vaccinazione, mentre la reazione consecutiva alla inoculazione di richiamo è stata uguale sia per le tre preparazioni monovalenti che per il trivalente.

Per il virus A la reazione alle tre preparazioni monovalenti è stata in ogni caso molto superiore a quella consecutiva del trivalente.

Uguale osservazione, benchè in maniera più limitata, si può fare per quanto riguarda il virus C.

CONCLUSIONI

Volendo trarre delle conclusioni di insieme dall'esperimento effettuato, si può in linea generale affermare:

1) la massima reazione anticorpale si è verificata a seguito della vaccinazione monovalente;

2) al secondo posto, a notevole distanza, si classificano le combinazioni vaccinali con due preparazioni monovalenti, seguite in termini più o meno evidenti, dalle preparazioni bivalenti;

3) all'ultimo posto invece, ed anche qui senza ombra di dubbio, si classificano indifferentemente le reazioni conseguenti alla vaccinazione con tre preparazioni monovalenti o con la combinazione trivalente;

4) l'aggiunta supplementare dei quantitativi di solo mestruo vaccinale senza virus, praticata in un soggetto per ogni gruppo, allo scopo di saggiare un eventuale potere coadiuvante l'immunità secondo la concezione del Ramon, non ha mostrato di avere influenzato in alcun senso la reazione anticorpale;

5) pur ritenendo che la parte preponderante nel meccanismo immunitario della virosi aftosa, sia affidata alla immunità istogena, non diamo minore importanza alle nostre osservazioni sierologiche in quanto esprimono il risultato di ricerche ottenute comparativamente ed in serie. E d'altra parte, tanto più riteniamo di essere nel vero, in quanto i risultati ottenuti, nel loro complesso, spiegano e confermano le osservazioni che erano state fatte al riguardo nella pratica dal punto di vista epizootologico.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.
Roma — Istituti Zooprofilattici del Lazio e della Toscana.

101. V. ZAVAGLI, V. MAZZARACCHIO, E. FONTANELLI, Z. ORFEI, A. D'AMORE, L. RAVAIOLI, B. CASTAGNOLI. — L'efficacia del vaccino antiaftoso per la profilassi dell'afta epizootica nei bovini con virus prodotto su cellule renali monostratificate.

Riassunto. — La vaccinazione, effettuata impiegando un vaccino monovalente « C » a concentrazione 40% di virus-coltura alla dose di 30 cm³, ha determinato nelle bovine da latte un alto potere protettivo per un periodo di 13 mesi. Solo al 14° mese dalla vaccinazione si è avuta una parziale rottura dell'immunità con più o meno evidenti lesioni boccali accompagnate da rilevamento termico, ma con mancata generalizzazione.

Il numero dei bovini utilizzati, la risposta dei tredici gruppi controllo, i dati serologici riscontrati, non lasciano alcun dubbio nella piena efficacia del vaccino impiegato nell'esperimento.

Summary. — Vaccination of milk cattle with 30 ml doses of a monovalent C vaccine containing 40% of virus-culture, gave good protection for 13 months. There was a partial loss in immunity only during the 14 th. month, with the production of more or less apparent buccal lesions and rises in temperature but without general signs of infection.

The number of cattle used, the response of thirteen control groups and the serological data confirm the full efficacy of the vaccine used in these experiments.

Sulle possibilità di sviluppo del virus aftoso in colture di cellule renali monostratificate e sua utilizzazione esiste una numerosissima bibliografia (1).

La prima comunicazione sulla utilizzazione delle colture di virus ottenute da cellule renali tripsinizzate di suino per la preparazione di un vaccino antiaftoso per bovini è stata da noi fatta nel 1957 (2, 3). Tale comunicazione si riferiva a ricerche preliminari compiute su 22 bovini immunizzati con vaccini monovalenti « O » e con vaccini monovalenti « A » unitamente a 6 bovini di controllo.

Due bovini, furono sottoposti a successive rivaccinazioni per rilevare l'eventuale insorgenza di fenomeni anafilattici causati da sostanze proteiche cellulari della coltura.

Il titolo medio del virus impiegato era di 10⁶/cm³; la sua percen-

tuale nel vaccino era del 20% in una prima serie vaccinale e del 30% in una seconda serie.

Si sono ottenuti i risultati seguenti:

— Per quanto si riferisce ai soggetti vaccinati con il monovalente « O », tutti i bovini trattati sia con la prima, che con la seconda serie a maggior percentuale di virus, hanno resistito alla inoculazione di prova, praticata dopo 22 giorni.

— Per quanto riguarda invece i bovini trattati col monovalente « A » è stato osservato che i soggetti inoculati con la serie a concentrazione del 20% di virus, non hanno tutti resistito alla infezione di prova, mentre i bovini trattati con la serie a concentrazione del 30% hanno tutti resistito all'inoculazione infettante.

I due bovini reinoculati per ricercare eventuale sensibilizzazione anafilattica, non hanno presentato alcuna reazione in tal senso.

Tale risultato è stato confermato da successive ricerche (4) con le quali è stato dimostrato che la specificità di specie delle cellule monostratificate ottenute per tripsinizzazione viene completamente perduta.

. . .

Questi risultati veramente incoraggianti, ci hanno consigliato di procedere ad un esperimento di vaccinazione su più larga scala utilizzando un cospicuo numero di bovini; ci hanno anche indicato l'opportunità di rivedere la tecnica di preparazione nel senso di utilizzare un maggior quantitativo di virus e di semplificarne la separazione dalle cellule.

. . .

Dopo una serie di controlli praticati sui bovini per stabilire le condizioni migliori per ottenere un vaccino a maggiore concentrazione di virus aftoso, specialmente per quanto riguarda la tecnica di separazione del virus dai residui cellulari, abbiamo iniziato nell'aprile del 1958, il previsto esperimento di vaccinazione su bovini con le seguenti modalità.

Abbiamo preparato un vaccino monovalente « C » secondo la classica tecnica di Waldmann con una percentuale però del 40% di virus-coltura e titolo di $10^{6.2}/\text{cm}^3$.

La tecnica di preparazione, come da noi indicata al XVI Congresso Mondiale Veterinario di Madrid (5), è stata la seguente:

in un recipiente di acciaio inossidabile si versa:

idrossido di alluminio	litri 38
soluzione di soda al 4,20%	litri 12
soluzione di glicocollo al 7,5% e cloruro di sodio al 6%	litri 10

Si fa il vuoto e si agita per 30', quindi si aggiungono litri 40 di virus-coltura: si agita nel vuoto per altri 30' e si aggiunge lo 0,5‰ di formalina del commercio al 35%, agitando poi per altri 30'.

La mescolanza messa in flaconi, viene tenuta in termostato a 25-26°C. durante 48 h e conservata quindi per 5 giorni alla temperatura di frigorifero di +4°C.

Per quanto riguarda la separazione del virus, si è adottato il sistema di centrifugare la coltura per 3' a 3000 giri filtrando poi il supernatante su cotone sterile. Ci siamo indirizzati verso questa tecnica perchè ci siamo resi conto che la filtrazione su filtri EK Seitz, anche con vari accorgimenti sul pH e sulla composizione del mestruo, portava ad una notevole riduzione del titolo del virus. La centrifugazione, d'altra parte, ci assicurava la completa assenza di qualsiasi elemento cellulare della coltura, perchè l'unico ostacolo per il totale adsorbimento del virus all'idrossido di alluminio è la presenza di residui cellulari.

Il vaccino così preparato, prima dell'impiego, veniva regolarmente controllato per la sterilità e la innocuità.

La scelta del vaccino monovalente « C » è stata determinata dalle seguenti considerazioni di ordine contingente: volendo fare un esperimento su di un vasto numero di animali, non abbiamo potuto comprare tutti i soggetti e mantenerli per un periodo di 14-15 mesi in locali separati, all'Istituto Zooprofilattico. Siccome molti grandi allevamenti da latte della provincia di Roma da anni non erano stati vaccinati con vaccino antiaftoso « C » nè vi erano stati focolai di tale virus, abbiamo proceduto a vaccinare molti capi in queste aziende.

L'assenza di anticorpi verso il virus « C » nel presiero della quasi totalità degli animali vaccinati, è stata una conferma di quanto sopra; i pochi soggetti che presentavano anticorpi nel siero (1:8-1:32) non avevano una anamnesi nota. Questi però, non sono stati utilizzati nell'esperienza.

L'esperienza è stata particolarmente fortunata in quanto durante il 1938 ed il 1939 non si sono verificati focolai di afta da virus « C » in tali allevamenti, nè nelle loro vicinanze.

I bovini vaccinati hanno pertanto continuato a vivere nelle norma-

li condizioni di allevamento, senza alcun onere finanziario da parte nostra.

L'Istituto Zooprofilattico ha provveduto solamente mese per mese, all'acquisto di alcuni soggetti, per sottoporli al controllo dell'efficacia.

MATERIALE E METODI.

Il controllo di efficacia è stato praticato a mezzo dell'inoculazione intralinguale con virus « C » ad alta virulenza (la prova d'infettività è stata compiuta inoculando cm^3 1 di epitelio fresco a titolo $10^6/\text{cm}^3$ in diversi punti dell'epitelio linguale).

La neutralizzazione con i sieri da saggiare è stata eseguita in vitro su colture di cellule tripsinizzate di rene di suino preparate secondo la tecnica usuale.

I sieri sono stati inattivati per 30' a 56°C e quindi diluiti progressivamente in ragione 2.

Le varie diluizioni dei sieri da titolare sono state mescolate con uguali quantità di virus diluito in modo che in $0,1 \text{ cm}^3$ fossero contenute circa 100 DCT_{50} .

La miscela siero-virus è stata tenuta a temperatura ambiente ($18-20^\circ\text{C}$ circa) per un'ora, e quindi inoculata in 4 tubi coltura per ciascuna diluizione nella quantità di $0,2 \text{ cm}^3$ per tubo.

Le letture dei risultati sono state eseguite dopo 1, 2, 3, 4 giorni dalla inoculazione, ed il titolo limite di neutralizzazione del siero è stato calcolato secondo il metodo di REED e MUENCH (6).

Per i 37 bovini dell'esperimento abbiamo riportato il titolo neutralizzante del siero prelevato il giorno precedente la vaccinazione e dopo 30 giorni, nonché il titolo del siero prelevato il giorno precedente l'inoculazione infettante.

Anche nei giorni consecutivi alla infezione, e per un periodo che va da un minimo di 6 giorni ad un massimo di 38 giorni, si è proceduto regolarmente al prelievo del sangue ed alla titolazione degli anticorpi.

RISULTATI.

Nella tabella sono raccolti tutti i dati relativi al controllo di efficacia e alle prove di neutralizzazione, alla comparsa delle lesioni locali primarie e della generalizzazione.

I soggetti vaccinati ed impiegati per la prova di efficacia sono stati

37, ripartiti in 13 gruppi e saggianti a distanza di 2-14 mesi dal trattamento vaccinale. I controlli, pure ripartiti in 13 gruppi, sono stati complessivamente 270.

Per i bovini controllo abbiamo riportato solamente il titolo degli anticorpi nel giorno precedente l'infezione di prova in quanto essi venivano sacrificati dopo 24 ore per la raccolta del virus.

Per quanto riguarda le lesioni osservate in questi soggetti, si può affermare che tutti gli animali hanno presentato alla 24^a ora circa, le caratteristiche lesioni da virus « C »; da questi abbiamo ricavato un quantitativo regolare di virus-epitelio.

Tutti i soggetti che erano stati sottoposti alla vaccinazione fino ad un periodo massimo di 13 mesi hanno resistito completamente all'inoculazione infettante di prova, solamente il soggetto n. 640, infettato dopo sei mesi dalla vaccinazione, ha presentato lesioni primarie boccali senza generalizzazione, in 4^a giornata dopo l'infezione.

Quest'unico soggetto che non ha resistito, si deve considerare come un'eccezione non significativa; si trattava evidentemente di un organismo che al momento della vaccinazione non fu capace di reagire con una risposta immunitaria (v. anche tutti gli indici serologici).

I soggetti, infettati dopo 14 mesi dalla vaccinazione, hanno dimostrato di possedere solo un'immunità parziale. Infatti il n. 3004 ha presentato una lesione locale alla lingua con rilevamento termico a 40^o,5 in 4^a giornata, il n. 2725 ha presentato lesioni locali estese a tutto l'epitelio linguale con rilevamento febbrile a 40^o,7 in 4^a giornata. In entrambi i soggetti però non si è avuta generalizzazione.

Un soggetto vaccinato da 8 mesi e che ha completamente resistito all'infezione di prova ha regolarmente partorito in 5^a giornata un vitello in perfette condizioni di salute.

La neutralizzazione ha dimostrato che:

1) i soggetti scelti per la prova e ripartiti nei tredici gruppi presentavano un titolo inferiore a 1:4;

2) dopo 30 giorni dalla vaccinazione in 32 soggetti si è notato un aumento degli anticorpi fino ad un massimo di 1:32;

3) gli esami eseguiti dopo l'inoculazione infettante di prova dimostrano che:

a) su 37 soggetti solamente 4 hanno mostrato una riduzione degli anticorpi al 2^o giorno della inoculazione del virus, fenomeno che è scomparso nei giorni successivi;

b) la maggioranza non ha mostrato alcuna variazione degli anticorpi nei primi 2 giorni successivi all'infezione, iniziando l'aumento in 3ª giornata. Il massimo titolo è stato raggiunto in 5-9ª giornata, solo eccezionalmente in 15-20ª giornata. Sei soggetti hanno presentato l'aumento degli anticorpi due giorni dopo l'infezione;

c) il titolo massimo anticorpale degli animali che sono rimasti sotto osservazione per un tempo maggiore, si è mantenuto invariato nel periodo dagli 11 ai 19 giorni per poi diminuire gradualmente.

Interessante è l'andamento degli anticorpi nei soggetti che non hanno resistito all'infezione praticata a 14 mesi dalla vaccinazione:

il primo, che aveva un titolo anticorpale di 1:16 il giorno precedente l'infezione, ha diminuito gli anticorpi a 1:8 in 72ª ora, ripristinando però il titolo di 1:16 il giorno successivo ed aumentandolo in 3ª giornata a 1:32, in 7ª giornata a 1:64, in 13ª giornata a 1:128 e mantenendo tale titolo fino al momento della macellazione avvenuta al 26º giorno;

il secondo, che aveva sempre dimostrato in precedenza un titolo inferiore a 1:4 si è mantenuto a 1:4 fino al 4º giorno dopo l'infezione, salendo a 1:8 al 5º giorno, a 1:16 al 9º giorno, a 1:32 al 13º giorno ed a 1:64 al 19º giorno conservandolo fino al momento della macellazione avvenuta il 26º giorno.

CONCLUSIONI

Il vaccino antiaftoso tipo Waldmann, preparato con virus coltura su cellule monostratificate, ha dimostrato un ottimo potere immunizzante.

In un primo esperimento, preparazione di vaccini monovalenti O ed A si è dimostrato attivo ad una concentrazione del 30% di virus coltura, preservando gli animali vaccinati dall'inoculazione infettante di prova dopo 22 giorni dalla vaccinazione.

La presente prova di vaccinazione fatta su larga scala impiegando un vaccino monovalente C a concentrazione 40% alla dose di 30 cm³ si è rivelata meglio rispondente agli scopi vaccinali. Tale vaccino ha provocato in tutti i soggetti controllati un alto potere protettivo determinando uno stato immunitario completo nelle bovine da latte per un periodo di 13 mesi. Solo al 14º mese dalla vaccinazione si è avuta una parziale rottura della immunità con più o meno evidenti lesioni boccali accompagnate da rilevamento termico, ma con mancata generalizzazione.

Il numero dei bovini utilizzati, la risposta univoca dei tredici gruppi controllo ed i dati serologici raccolti, non lasciano alcun dubbio sulla piena efficacia del vaccino impiegato nell'esperimento.

La necessità di poter avere sempre a disposizione quantitativi di virus dei diversi ceppi (con i nuovi virus africani ed asiatici) troverà solo con questo metodo la pratica risoluzione.

Una più vasta esperienza di tali vaccini in campo internazionale potrà confermare l'utilità pratica di tale metodo. Infatti i risultati da noi qui comunicati ci consentono di affermare che si tratta di una preparazione che provoca una completa azione vaccinante con una metodica più rispondente alle attuali esigenze.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.

Roma — Istituti Zooprofilattici del Lazio e della Toscana.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) FONTANELLI E., ORFEI Z. e TESTI B. - « La methode des cultures cellulaires monostratifiées, un très important aide pour le laboratoire de recherche dans les epizooties à virus » - Rapport à la XXVIII Session de l'O.I.E., 9: 14 (1960).
- (²) MAZZARACCHIO V., ZAVAGLI V., ORFEI Z., D'AMORE A., RAVAIOLI L. e CASTAGNOLI B. - Zooprofilassi, 12: 539 (1957).
- (³) MAZZARACCHIO V., ZAVAGLI V., ORFEI Z., D'AMORE A., RAVAIOLI L. e CASTAGNOLI B. - Off. Int. Epiz., 49: 93 (1958).
- (⁴) RAVAIOLI L. - Atti Soc. It. Sc. Vet., 13: 525 (1959).
- (⁵) ZAVAGLI V., MAZZARACCHIO V., FONTANELLI E., ORFEI Z., D'AMORE A., RAVAIOLI L. e CASTAGNOLI B. - La nouvelle vaccination antiaphteuse avec un virus cultivé sur des cellules renales de porc - Communications XVI Congreso Mundial de Veterinaria, Vol. II, Madrid 21 maggio 1959, pag. 401.
- (⁶) REED T. e MUENCH E. - Am. J. Hyg., 27: 493 (1938).

Questo articolo è una rassegna del lavoro sul metabolismo cerebrale eseguito nel laboratorio di Chimica Biologica dell'Istituto Superiore di Sanità negli ultimi 3 anni da A. Beloff-Chain, R. Catanzaro, M. M. Cohen, I. Masi, S. Larsson, F. Pocchiari, W. Reading, C. Rossi, R. Sandman, O. Z. Sellinger e E. B. Chain.

Il quadro del metabolismo del glucosio nel tessuto cerebrale ⁽¹⁾ differisce notevolmente da quello osservato in altri tessuti quali il muscolare, l'epatico e l'adiposo ^(2, 3, 4), (Fig. 1). Mentre infatti in questi ultimi tessuti il glucosio è principalmente trasformato in glicogeno, oligosaccaridi e acido lattico, nel tessuto cerebrale esso viene in notevole quantità trasformato in aminoacidi, ed in particolare, in acido glutammico, acido aspartico, acido γ -amminobutirrico, alanina e glutammina (Fig. 2).

La determinazione quantitativa dei metaboliti radioattivi formati è stata effettuata direttamente su carta con una apparecchiatura automatica (Fig. 3) per la misura di radiocromatogrammi bidimensionali, appositamente realizzata presso questo Istituto ^(5, 6).

La distribuzione del ¹⁴C da glucosio, fruttosio, piruvato ed acetato ^(7, 8) è mostrata nella tabella I. Il piruvato e il glucosio erano i substrati che più attivamente venivano metabolizzati: la trasformazione del piruvato in aminoacidi e in CO₂ era di gran lunga superiore a quella del glucosio. L'utilizzazione del fruttosio, d'altra parte, era molto più bassa di quella del glucosio ed infine, contrariamente ad ogni aspettativa, l'acetato veniva utilizzato soltanto in piccolissima quantità. La formazione degli aminoacidi dai carboidrati e dal piruvato è un processo strettamente aerobico; in condizioni anaerobiche la scomparsa del glucosio era soltanto il 7-15% di quella in condizioni aerobiche; di questa quantità l'80% era trasformato in acido lattico e il 20% appariva come glucosio libero intracellulare ⁽¹⁾. Nella tabella II vengono paragonate le quantità di acido lattico formate in ossigeno e in azoto; si vede chiaramente che la formazione dell'acido lattico in azoto è circa un terzo di quella che si osserva in ossigeno.

Il metabolismo del glucosio è stato anche studiato in differenti parti del cervello di coniglio ⁽⁹⁾ (tabella III). Si è trovato che la distribuzione del ¹⁴C in tutte le parti del cervello studiate era la stessa, ad eccezione del γ -ammino-butirrico, la cui formazione nell'ipotalamo era maggiore di quella osservata nella corteccia cerebrale e in quella cerebellare. Du-

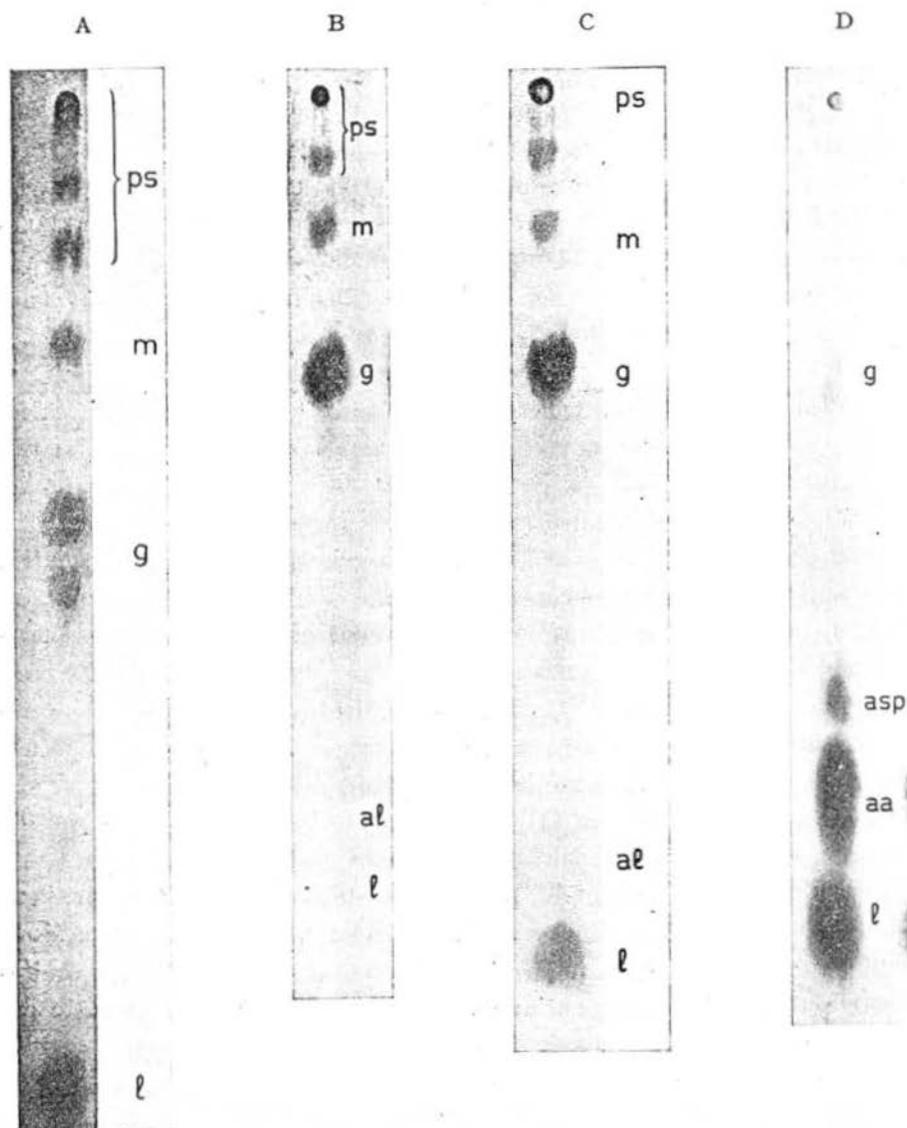


Fig. 1. - Autoradiografia di cromatogrammi su carta di estratti alcoolico-acquosi di tessuti di ratto incubati con glucosio generalmente marcata ^{14}C .

(A = tessuto muscolare; B = tessuto epatico; C = tessuto adiposo bruno; D = tessuto cerebrale; ps = glicogeno e oligosaccaridi; m = maltosio; g = glucosio; l = acido lattico; al = alanina; asp = acido aspartico; aa = miscela di amminoacidi: acido glutammico, alanina, acido γ -ammino-butirrico. Solvente: acido picrico: alcool butilico terziario: acqua).

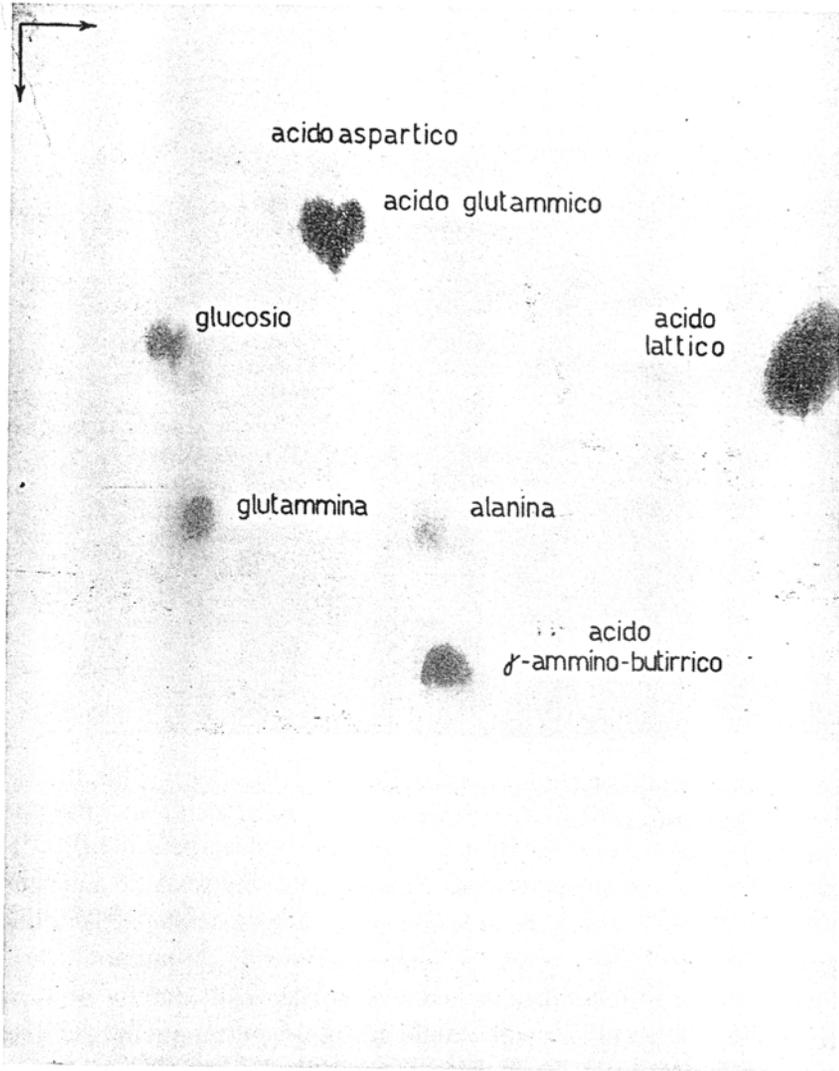


Fig. 2. - Autoradiografia di un cromatogramma bimensionale su carta di estratto alcoolico acquoso di cervello di ratto incubato con glucosio generalmente marcato ^{14}C . (Solventi: \rightarrow alcool butilico secondario: acido formico: acqua \downarrow fenolo: acqua: idrato di ammonio).

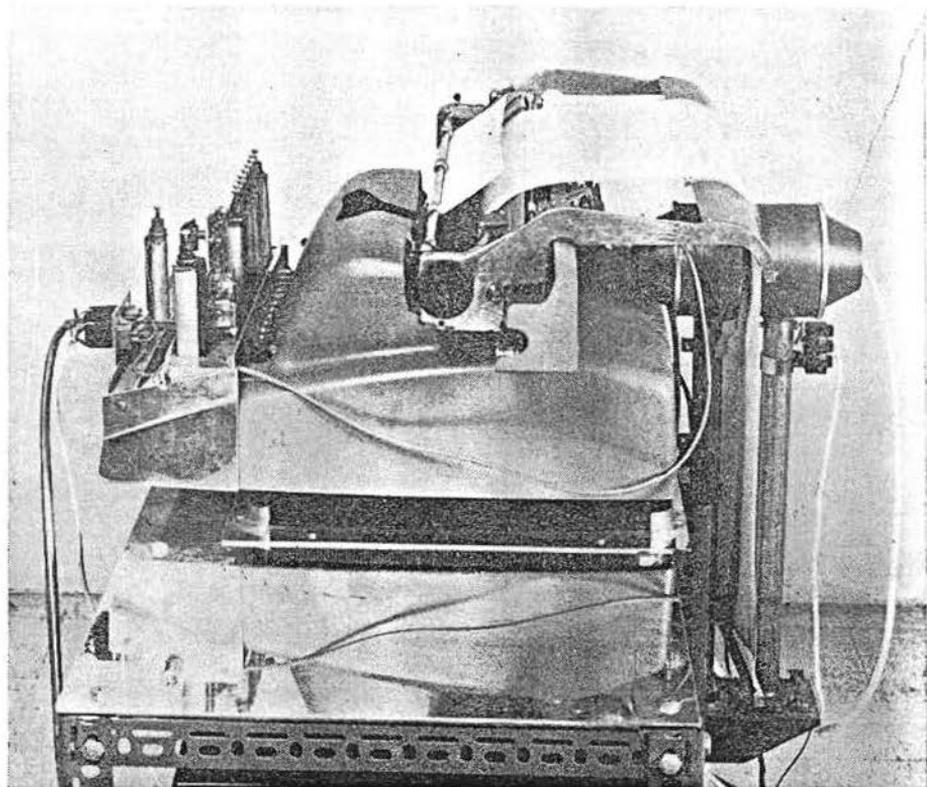


Fig. 3. - Apparecchiatura per la misura automatica di radiocromatogrammi su carta.

rante questi studi si è scoperto un interessante effetto dello ione potassio, quello cioè di stimolare enormemente la formazione della glutammina da glucosio. Questo effetto era specifico per la glutammina; le produzioni di acido glutammico, di acido aspartico e di alanina non venivano infatti significativamente influenzate, mentre quella dell'acido γ -amminobutirrico era leggermente aumentata (Fig. 4).

In animali carenti di vitamina B₆ (10) non è stato notato alcuno effetto sulla formazione dell'acido aspartico, dell'acido glutammico e dell'acido γ -amminobutirrico, mentre si è trovata una significativa riduzione nella formazione della alanina; tale effetto era anche più pronunciato nella ipofisi di ratto (tabella IV). In questo tessuto il metabolismo del glucosio è simile a quello del cervello per quel che concerne la trasformazione in acido aspartico, acido glutammico e alanina, mentre è differente per il fatto che non si forma acido γ -ammino-butirrico e si for-

TABELLA I

METABOLISMO DEL GLUCOSIO, FRUTTOSIO, PIRUVATO ED ACETATO IN FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(Valori medi \pm e.s. espressi come μg di substrato trasformato per 50 mg di tessuto (peso umido) dopo 60 min. di incubazione a 37° in O_2 in 0,6 ml. di un tampone di fosfati a pH 6,8. Concentrazione del substrato: 0,1%; radioattività = 10 μC per vaschetta. Glucosio e fruttosio uniformemente marcati con ^{14}C ; piruvato marcato nel carbonio — 3, acetato nel carbonio — 2. In parentesi il numero delle esperienze).

Metaboliti formati dai substrati	Substrati			
	Glucosio (6)	Fruttosio (4)	Piruvato (8)	Acetato (14)
CO_2	55,1 \pm 3,8	26,5 \pm 2,1	94,3 \pm 5,8	1,4 \pm 0,1
Acido lattico	170,2 \pm 19,4	29,6 \pm 1,6	191,1 \pm 21,7	—
Alanina	3,9 \pm 0,3	1,7 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1	—
Acido aspartico	6,6 \pm 0,3	3,8 \pm 0,7	49,5 \pm 2,0	tracce
Acido glutammico	23,9 \pm 1,9	9,0 \pm 0,5	111,7 \pm 8,0	tracce
Acido γ -amminobutir- rico	7,8 \pm 0,6	1,3 \pm 0,1	12,8 \pm 0,8	—

mano glicogeno e ammino acidi incorporati nella frazione proteica (tabella V).

Studi sulla origine dell'azoto negli amminoacidi formati da glucosio nel cervello di ratto sono stati eseguiti con lo ione ammonio marcato ^{15}N (¹¹). Gli amminoacidi venivano separati su una colonna di resine a scambio ionico Dowex 50 secondo la tecnica di MOORE e STEIN (¹²); per ognuno di essi, oltre al dosaggio chimico, venivano determinati il con-

TABELLA II

FORMAZIONE DI ACIDO LATTICO DA GLUCOSIO IN FETTINE DI CERVELLO DI RATTO INCUBATE IN CONDIZIONI AEROBICHE ED ANAEROBICHE

(Risultati espressi come μg di glucosio trasformato in acido lattico per 50 mg di tessuto, (peso umido) dopo 60 minuti di incubazione a 37° in O_2 o in N_2 in 0,6 ml di un tampone di fosfati a pH 6,8. Concentrazione del glucosio: 0,1%; radioattività 10 μC per vaschetta. Valori medi di 4 esperienze \pm e.s.).

O_2	N_2
240,8 \pm 13,8	85,1 \pm 2,7

TABELLA III

METABOLISMO DEL GLUCOSIO IN DIFFERENTI PARTI DEL CERVELLO DI CONIGLIO E NEL CHIASMA OTTICO

(Risultati espressi come μg di glucosio trasformato per 25 mg di tessuto (peso umido) dopo 60 min. di incubazione in O_2 a 37° in 0,4 ml di un tampone di fosfati contenente ioni sodio (Na^+) o ioni potassio (K^+). Concentrazione del glucosio 0,1%; radioattività: 40 μC per vaschetta. Valore medi \pm e.s.).

Tessuto	Mezzo	Numero delle esper.	Alanina	Acido aspartico	Acido glutammico	Acido γ -amminobutirrico	Glutammina	CO_2	Acido lattico
Ipotalamo mediale anteriore	Na^+	5	$0,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,3$	$3,4 \pm 5,3$	tracce	$20,2 \pm 0,4$	$116,9 \pm 3,4$
	K^+	4	$0,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,2^*$	$14,6 \pm 1,2^*$	$100,0 \pm 9,8$
Ipotalamo mediale posteriore	Na^+	5	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,5$	tracce	$21,6 \pm 1,5$	$111,7 \pm 5,4$
	K^+	5	$0,6 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,7$	$3,1 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,5^*$	$15,4 \pm 4,0^*$	$92,9 \pm 17,0$
Ipotalamo laterale anteriore	Na^+	5	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,4$	tracce	$25,4 \pm 1,9$	$119,3 \pm 15,3$
	K^+	5	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,5^*$	$15,1 \pm 4,0^*$	$105,2 \pm 12,2$
Corteccia cerebrale	Na^+	5	$1,4 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$	$9,8 \pm 1,8$	$1,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$	$19,6 \pm 2,2$	$93,2 \pm 12,6$
	K^+	4	$1,5 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,3$	$12,2 \pm 3,1$	$2,8 \pm 0,9$	$2,8 \pm 1,0^*$	$26,9 \pm 2,8^*$	$126,2 \pm 25,2$
Corteccia cerebellare	Na^+	5	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$	$5,3 \pm 1,2$	$0,8 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,3$	$20,0 \pm 1,3$	$89,4 \pm 6,7$
	K^+	3	$0,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,05^*$	$18,7 \pm 1,6$	$94,4 \pm 7,5$
Chiasma ottico	Na^+	4	tracce	tracce	$2,6 \pm 1,0$	tracce	tracce	$6,1 \pm 1,2$	$66,0 \pm 7,7$
	K^+	2	tracce	tracce	$1,5 \pm 0,2$	tracce	tracce	$4,9 \pm 0,4$	$50,7 \pm 9,7$

* Differenza statisticamente significativa, $p < 0,1$.

TABELLA IV

INFLUENZA DELLA CARENZA IN VITAMINA B₆ SULLA FORMAZIONE DI AMMINO ACIDI DA GLUCOSIO NELL'IPOFISI ISOLATA E NELLE FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(Valori medi \pm e.s. espressi come μ g di glucosio trasformato per 20 mg di ipofisi (peso umido) e per 30 mg di tessuto cerebrale dopo incubazione a 37° in O₂ in un tampone di fosfati a pH 6,8 per i periodi di tempo indicato. Concentrazione del glucosio: 0,1%; radioattività: 10 μ C per vaschetta. In parentesi il numero delle esperienze).

Tempo di incubazione	Ipofisi		Cervello	
	3 ore		1 ora	
	Normale (8)	Carente di Vitamina B ₆ (8)	Normale (15)	Carente di Vitamina B ₆ (23)
Alanina	8,4 \pm 0,3	4,3 \pm 0,5	2,1 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1
	p < 0,001		p < 0,01	
Acido aspartico	4,4 \pm 0,5	4,5 \pm 0,3	6,2 \pm 0,3	6,5 \pm 0,3
Acido glutammico	5,9 \pm 0,4	6,7 \pm 0,8	26,0 \pm 1,2	28,5 \pm 1,3
Ammino acidi proteici	1,3 \pm 0,1	1,2 \pm 0,07	—	—
Acido γ -amminobutir- rico	—	—	4,8 \pm 0,2	5,3 \pm 0,2

TABELLA V

METABOLISMO DEL GLUCOSIO NELL'IPOFISI ISOLATA E NELLE FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(Risultati espressi come μ g di glucosio trasformato per 20 mg di tessuto (peso umido) dopo 3 ore di incubazione in O₂ a 37° in 0,4 ml di un tampone di fosfato a pH 6,8. Concentrazione del glucosio: 0,1%; radioattività: 10 μ C per vaschetta. Valori medi di 6 esperienze \pm e.s.).

Frazione	Ipofisi	Fettine di cervello
Alanina	6,7 \pm 0,3	3,2 \pm 0,1
Acido aspartico	4,7 \pm 1,2	4,7 \pm 0,5
Acido glutammico	4,0 \pm 0,3	14,5 \pm 1,0
Acido γ -ammino butirrico	—	4,4 \pm 0,4
Acido lattico	60,5 \pm 6,2	104,5 \pm 7,8
CO ₂	16,6 \pm 2,2	58,0 \pm 7,7
Glicogeno e oligosaccaridi	1,0 \pm 0,1	—
Ammino acidi proteici	0,9 \pm 0,2	—

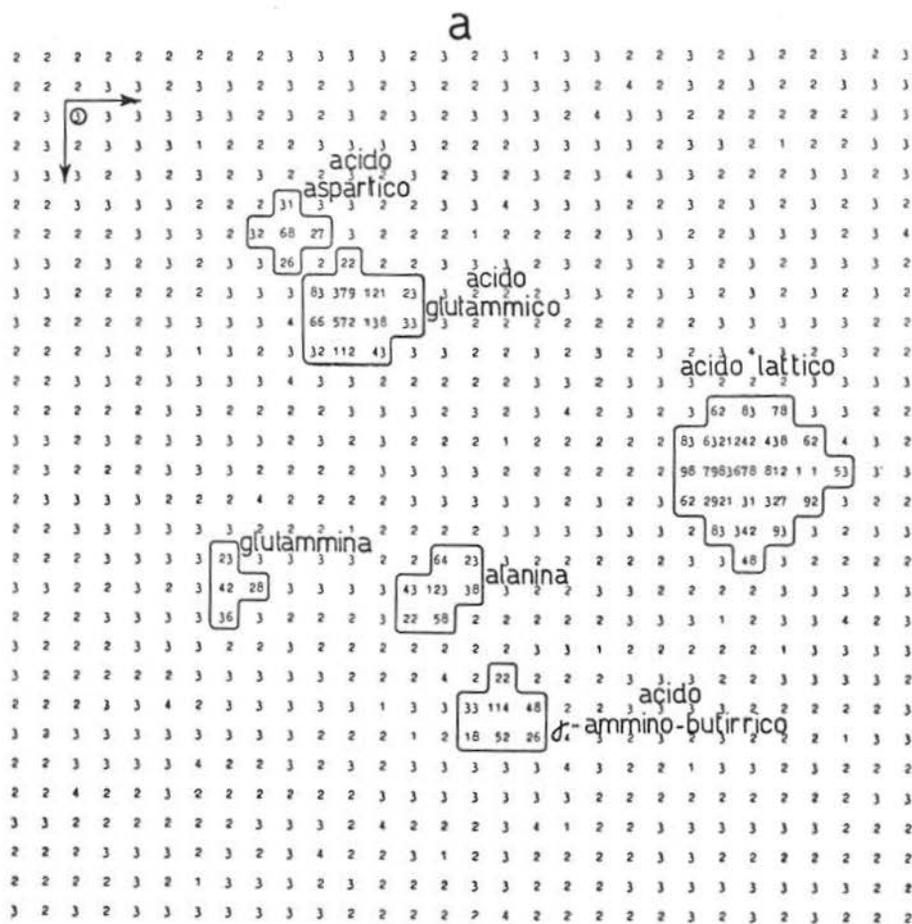
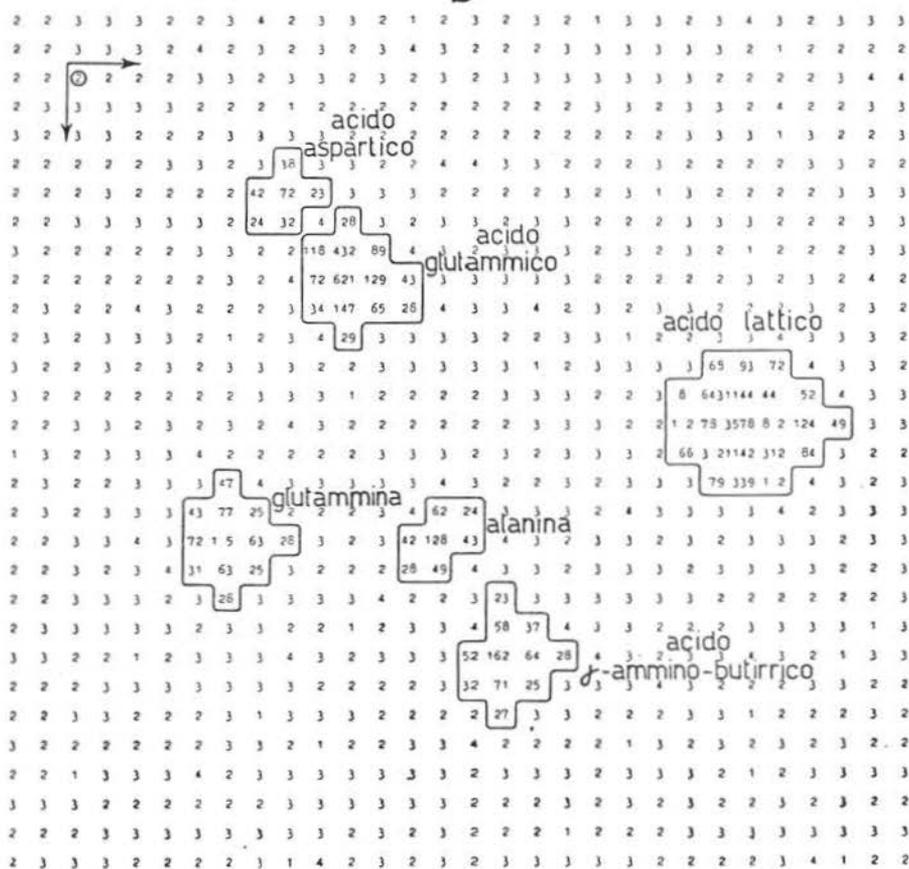


Fig. 4. - Mappe numeriche di radiocromatogrammi alcoolico-acquosi di cervello di coniglio in presenza (a) e in assenza (b) di ioni potassio. Le mappe sono state ottenute con l'apparecchiatura...

b



mi bimedimensionali su carta di estratti
 con glucosio generalmente marcata ^{14}C .
 di ioni potassio; solventi: vedi fig. 2. Le
 mostrata in fig. 3).

tenuto in ^{15}N e la radioattività. La figura 5 mostra la coincidenza tra la curva di eluzione degli amminoacidi determinati col metodo alla ninidrina e la curva della radioattività. Le attività specifiche dei singoli amminoacidi sono riportate in tabella 6; da tale tabella appare chiaramente che l' ^{15}N proveniente dall'ammonio marcato veniva prontamente incorporato nell'acido aspartico, nell'acido glutammico e nella glutammina e in quantità di gran lunga inferiori nella glicina, nella alanina e nell'acido γ -ammino-butirrico. La percentuale degli amminoacidi radio-

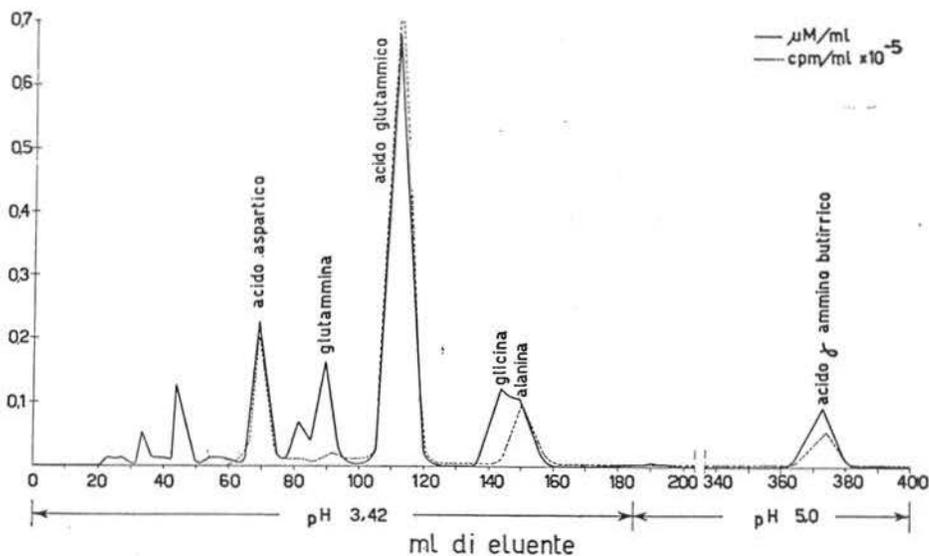


Fig. 5. - Curva di eluzione ottenuta sottoponendo un estratto alcolico acquoso di cervello di ratto incubato con glucosio generalmente marcato ^{14}C a cromatografia su una colonna di Dowex 50 di cm. 0.9×100 .

attivi — cioè a dire gli amminoacidi di nuova formazione provenienti dal glucosio — contenenti ^{15}N era data dal rapporto $B/A \cdot 100$ (vedi tabella VI). L'acido aspartico, l'acido glutammico e la glutammina di nuova formazione avevano l' ^{15}N incorporato per circa il 50% mostrando così che lo ione ammonio è un attivo metabolita nel metabolismo cerebrale. La alanina invece mentre aveva un'attività specifica nel carbonio molto alta, conteneva soltanto una piccola quantità di ^{15}N e pertanto il rapporto $B/A \cdot 100$ era molto basso; ciò vuol dire che l'azoto dell'alanina deve derivare da altre sorgenti diverse dallo ione ammonio; lo stesso si applica per la glicina e, contrariamente ad ogni aspettativa, anche per l'acido γ -ammino-butirrico.

CONCENTRAZIONE DI ALCUNI AMMINO ACIDI E DISTRIBUZIONE DELLA MARCATURA DOPO INCUBAZIONE DI FETTINE DI CERVELLO DI RATTO CON GLUCOSIO ^{14}C E $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$

Aminoacidi *	Concentrazione ($\mu\text{M/g}$ di tessuto)		Percentuale di aminoacido marcato			
	Totale	Radioattivo	in ^{14}C A	in ^{15}N B	$\frac{B}{A} \cdot 100$	
Acido aspartico	$2,20 \pm 0,1$	$0,50 \pm 0,04$	$23,0 \pm 2,0$	$12,1 \pm 0,6$	53 ± 6	
Glutamina	$3,30 \pm 0,3^{**}$	$0,38 \pm 0,07^{**}$	$11,0 \pm 1,0$	$5,7 \pm 0,03$ (amminico)	53 ± 8 (amminico)	
Acido glutammico	$10,90 \pm 0,6$	$3,52 \pm 0,27$	$32,3 \pm 0,9$	$13,9 \pm 0,03$	43 ± 2	
Glicina	$1,60 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,01$	$16,6 \pm 2,3$	$0,70 \pm 0,16$	5 ± 1	
Alanina	$2,20 \pm 0,3$	$1,41 \pm 0,23$	$63,0 \pm 3,5$	$3,40 \pm 1,0$	5 ± 1	
Acido γ -ammino-butyrico	$2,90 \pm 0,6$	$1,32 \pm 0,41$	$43,3 \pm 5,9$	$3,84 \pm 1,1$	9 ± 2	

* Valori medi di 3 esperienze, in ognuna delle quali vennero usati i cervelli riuniti di 5 animali.

** Il valore reale della glutamina è considerevolmente maggiore dato che nella tecnica usata viene distrutto il 50% circa di questo aminoacido.

duzione di $^{14}\text{CO}_2$ da acido glutammico ^{14}C non solo non diminuiva, come si sarebbe potuto aspettare se il glucosio fosse stato preferenzialmente ossidato, ma, anzi, aumentava (tabella VII) (8. 13).

Risultati simili sono stati anche osservati in studi eseguiti sulla retina isolata di ratto (14).

Contro ogni aspettativa si è trovato inoltre che l'attività specifica della $^{14}\text{CO}_2$ da acido glutammico ^{14}C era la stessa sia in presenza, che in

TABELLA VII

INTERAZIONE TRA LE OSSIDAZIONI DEL GLUCOSIO E DEL GLUTAMMATO IN FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(Risultati espressi in: a) μM di CO_2 formate per 200 mg di tessuto (peso umido); b) attività specifica relativa a quella del substrato fatta uguale ad 1. Il tessuto è stato incubato per 2 ore in O_2 a 37° in 3 ml di tampone di fosfati a pH 4.7. Concentrazione del substrato: 0,1%. Valori medi di 6 esperienze \pm e.s.).

Substrati	a) μM di CO_2	b) Attività specifica relativa
^{14}C -glucosio	50,2 \pm 2,6	0,64 \pm 0,03
^{14}C -glucosio + glutammato	53,7 \pm 1,0	0,37 \pm 0,02
^{14}C -glutammato	30,4 \pm 2,7	0,37 \pm 0,02
^{14}C -glutammato + glucosio	55,3 \pm 1,1	0,41 \pm 0,01

assenza di glucosio mostrando così che in presenza dei due substrati, l'acido glutammico veniva preferenzialmente ossidato (tabella VII). E' ben noto che il glucosio stimola il consumo di ossigeno in presenza di acido glutammico (15). Dato però che l'attività specifica della $^{14}\text{CO}_2$ da acido glutammico non cambiava in presenza di glucosio mentre la quantità totale di $^{14}\text{CO}_2$ prodotta dall'acido glutammico aumentava, ne segue che il glucosio deve stimolare non solo l'ossidazione dell'acido glutammico, ma anche l'ossidazione di altre sostanze. Il fatto che il valore dell'attività specifica della $^{14}\text{CO}_2$ da glucosio veniva ridotto in presenza di acido glutammico inerte (tabella VII), ulteriormente prova che l'acido glutammico è ossidato preferenzialmente al glucosio.

Nello studio sul metabolismo dell'acido glutammico nel tessuto cerebrale si è trovato che esso veniva principalmente trasformato in acido aspartico, acido γ -ammino-butirico e glutammina. In presenza di glucosio inerte la formazione della glutammina radioattiva aumentava notevolmente mentre quella dell'acido aspartico diminuiva (tabella VIII).

INFLUENZA DEL GLUCOSIO SUL METABOLISMO DEL GLUTAMMATO IN FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(Risultati espressi come μg di acido glutammico trasformato e μM di O_2 consumato per 50 mg di tessuto, (peso umido) dopo 60 min. di incubazione in O_2 a 37° in 0.6 ml di un tampone di fosfati a pH 7.4. Radioattività del glutammato generalmente marcato ^{14}C : 10 μC per vaschetta; concentrazione: 0,06% in acido glutammico. Valori medi di 8 esperienze \pm e.s.).

Concentrazione del glucosio	CO_2	Acido aspartico	Acido γ -amminobutirrico	Glutamina	Acido glutammico	Consumo* di ossigeno (μM)
0	$55,0 \pm 3,9$	$75,5 \pm 3,9$	$4,2 \pm 0,4$	$11,2 \pm 2,5$	$26,0 \pm 1,1$	$4,0 \pm 0,3$
0,1%	$61,6 \pm 5,5$	$17,7 \pm 0,9$	$6,9 \pm 0,4$	$34,6 \pm 3,9$	$94,1 \pm 5,1$	$5,4 \pm 0,2$

* Valori medi di 14 esperienze.

INFLUENZA DI ALCUNI INTERMEDI DEL METABOLISMO DEI CARBOIDRATI SULLA TRASFORMAZIONE DELL'ACIDO GLUTAMMICO IN ACIDO ASPARTICO. GLUTAMMINA ED ACIDO γ -AMMINOBUTIRRICO IN FETTINE DI CERVELLO DI RATTO.

(Risultati espressi come μg di acido glutammico trasformato per 50 mg di tessuto (peso umido) dopo 60 min. di incubazione in O_2 a 37° in 0,6 ml di un tampone di fosfati a pH 7,4. Radioattività del glutammato generalmente marcato ^{14}C : 10 μC per vaschetta; concentrazione: 0,06% in acido glutammico.

Substrati aggiunti	Numero delle esperienze	Acido glutammico	Acido aspartico	Glutamina	Acido γ -amminobutirrico
—	8	26,0	75,5	11,2	4,2
Glucosio	8	94,1	17,7	36,4	6,9
Acido piruvico	4	65,9	20,1	17,4	4,5
Acido α -chetoglutarico	4	20,0	21,8	7,0	2,4
Acido citrico	1	22,6	79,3	6,5	5,8
Acido succinico	4	19,6	67,6	7,1	3,7
Acido malico	1	20,1	60,7	2,2	2,6
Acido ossalacetico	3	25,8	79,4	2,0	5,4

TABELLA X

INFLUENZA DEL PIRUVATO E DI ALCUNI INTERMEDI DEL CICLO DEGLI ACIDI TRICARBOSSILICI SULLA TRASFORMAZIONE DEL GLUTAMMATO NEGLI ACIDI α -CHETOGLUTARICO, MALICO, CITRICO E SUCCINICO

(Risultati espressi come μg di acido glutammico trasformato per 50 mg di tessuto (peso umido) dopo 60 min. di incubazione in O_2 a 37° in 0,6 ml di un tampone di fosfati a pH 7,4. Radioattività del glutammato generalmente marcato ^{14}C : 10 μC per vaschetta; concentrazione 0,06% in acido glutammico. Concentrazione degli intermedi aggiunti: 0,1%).

Substrati aggiunti	Acido α -cheto-glutarico	Acido malico	Acido citrico	Acido succinico
Acido piruvico	22,3	4,5	2,1	—
Acido α -chetoglutarico	206,5	16,5	—	14,9
Acido succinico	8,0	8,3	—	—
Acido malico	4,7	26,0	tracce	6,9
Acido citrico	2,2	5,3	1,8	2,4
Acido ossalacetico	6,7	—	—	0,9

TABELLA XI

INFLUENZA DEL GLUCOSIO SUL METABOLISMO DELL'ASPARTATO IN FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(Risultati espressi come μg di acido aspartico trasformato e μM di O_2 consumato per 50 mg di tessuto (peso umido) dopo 60 min. di incubazione in O_2 a 37° in 0,6 ml di un tampone di fosfati a pH 7,4. Radioattività dell'aspartato generalmente marcato ^{14}C : 10 μC per vaschetta; concentrazione 0,03% in acido aspartico).

Concentrazione del glucosio	CO_2	Acido glutammico	Acido γ -ammino butirrico	Glutammina	Acido aspartico	Consumo di ossigeno (μM)
0	19,9	13,5	tracce	tracce	28,9	2,9
0,1%	77,3	60,6	2,8	8,8	42,7	6,8
0,2%	77,2	65,8	2,4	8,1	57,2	6,6

EFFETTI DEL GLUCOSIO SUL METABOLISMO DI FETTINE DI CERVELLO DI RATTO

(+ indica un aumento maggiore di 2 volte) ++ un aumento da 2 a 4 volte e +++ un aumento maggiore di 4 volte; — — indica una diminuzione ad un terzo).

Metaboliti formati	Substrato			
	acetato	piruvato	aspartato	glutamato
CO ₂	+		+++	+
Acido lattico		++		
Acido aspartico				— —
Acido glutammico	+		+++	
Glutammina			+++	+++
Acido γ -ammino butirrico	+		+++	+

Si è trovato che anche l'acido aspartico veniva ossidato dalle fettine di cervello di ratto anche se in quantità di gran lunga inferiore a quella dell'acido glutammico; come metabolita principale si formava l'acido glutammico (Fig. 7). Il glucosio stimolava l'ossidazione dell'acido aspartico (circa 3-4 volte) e la sua trasformazione in ammino acidi. Infatti in aggiunta all'acido glutammico in presenza di glucosio comparivano anche, in notevole quantità, la glutammina e l'acido γ -amminobutirrico presenti solo in tracce in assenza di glucosio (tabella XI).

Da tutte queste osservazioni appare chiaramente che il glucosio ha molteplici effetti specifici sul metabolismo cerebrale (tabella XII). Essi sono: 1) stimolo della produzione dell'acido lattico dall'acido piruvico; 2) stimolo della produzione di glutammina e, in minor quantità, di quella dell'acido γ -ammino-butirrico dall'acido aspartico e dall'acido glutammico; 3) stimolo della formazione di acido glutammico dall'acido aspartico; 4) riduzione della formazione dell'acido aspartico dall'acido glutammico.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I. e POCCHIARI F. - Proc. roy. Soc. B, 144: 22 (1935).
 - (²) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I., POCCHIARI F. e ROSSI C. - Proc. roy. Soc. B, 143: 481 (1935).
 - (³) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I. e POCCHIARI F. - Selected sci. Papers Ist. sup. Sanità, 1: 293 (1936).
 - (⁴) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I. e POCCHIARI F. - Selected sci. Papers Ist. sup. Sanità, 1: 345 (1936).
 - (⁵) CHAIN E. B., FRANK M., POCCHIARI F., ROSSI C., UGOLINI F. e UGOLINI G. - Selected sci. Papers Ist. sup. Sanità, 1: 239 (1936).
 - (⁶) FRANK M., CHAIN E. B., POCCHIARI F. e ROSSI C. - Selected sci. Papers Ist. sup. Sanità, 2: 75 (1939).
 - (⁷) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I. e POCCHIARI F. - Selected sci. Papers Ist. sup. Sanità, 2: 122 (1939).
 - (⁸) SELLINGER O. Z., CATANZARO R., POCCHIARI F. e CHAIN E. B. - (In preparazione).
 - (⁹) CHAIN E. B., LARSSON S. e POCCHIARI F. - Proc. roy. Soc. B, 152: 283 (1960).
 - (¹⁰) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I. e POCCHIARI F. - Selected sci. Papers Ist. sup. Sanità, 2: 109 (1939).
 - (¹¹) CHAIN E. B., CHIOZZOTTO M., POCCHIARI F., ROSSI C. e SANDMAN R. - Proc. roy. Soc. B, 152: 290 (1960).
 - (¹²) MOORE S. e STEIN W. H. - J. biol. Chem., 192: 663 (1951).
 - (¹³) CHAIN E. B., COHEN M. M. e POCCHIARI F. - (In preparazione).
 - (¹⁴) READING W., POCCHIARI F. e CHAIN E. B. - (In preparazione).
 - (¹⁵) KREBS H. A. - Biochem. J., 29: 1620 (1935).
-

103. A. BALLIO e Serena RUSSI. — La struttura del galattosil-lattosio, un trisaccaride prodotto dal lattosio ad opera del *Penicillium chrysogenum* Thom.

Riassunto. — Il galattosil-lattosio, che rappresenta il principale oligosaccaride sintetizzato per azione della transgalattosilasi del *Penicillium chrysogenum* Thom sul lattosio, è l'O-β-D-galattopiranosil-(1→6)-O-β-D-galattopiranosil-(1→4)-D-glucopiranosio.

Summary. — Galactosyl-lactose, the main oligosaccharide synthesized from lactose by the transgalactosylase of *Penicillium chrysogenum* Thom, is O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-O-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose.

L'incubazione di estratti di *Penicillium chrysogenum* Thom con il lattosio dà luogo alla formazione di numerosi oligosaccaridi riducenti (1); il prodotto principale di questa reazione, accanto al glucosio, è un trisaccaride (galattosil-lattosio) che si produce a seguito del trasferimento della porzione galattosidica di una molecola di lattosio ad una seconda molecola di lattosio. In questo lavoro viene chiarita in modo definitivo la struttura chimica di questo trisaccaride (*). Il galattosil-lattosio necessario per questo studio (alcuni grammi) è stato isolato dai filtrati di colture del *P. chrysogenum* sviluppato in terreni contenenti lattosio. In un precedente lavoro (2) era stato infatti dimostrato che la maggior parte degli oligosaccaridi sintetizzati per azione di preparati enzimatici della muffa sul lattosio, è prodotta anche in tali terreni, i quali costituiscono ovviamente una fonte più accessibile per l'isolamento di questi composti in quantità sufficienti per uno studio chimico completo. Il frazionamento della miscela complessa di zuccheri si eseguiva mediante cromatografia su colonna di cellulosa o di carbone-celite (4), ed il galattosil-lattosio si purificava infine mediante precipitazione con acetone da una soluzione in alcool metilico.

Le determinazioni del peso molecolare, eseguite con due metodi diversi, davano valori in buon accordo con quelli corrispondenti ad un trisaccaride. L'idrolisi acida dava luogo a circa 2 moli di galattosio per mole di glucosio. La cromatografia su carta dei prodotti di idrolisi par-

(*) Una nota preliminare era stata pubblicata nel 1937 (2).

ziale indicava la presenza, accanto al glucosio ed al galattosio, del lattosio e del 6- O - β -galattopiranosil-D-galattopiranosio. Per ossidazione con ipoidio in ambiente alcalino, seguita da idrolisi acida, il trisaccaride liberava un solo zucchero riducente, identico al galattosio, e acido gluconico. La dimostrazione conclusiva della struttura del galattosil-lattosio era fornita dalla identificazione dei prodotti ottenuti per idrolisi acida del suo endecametilere. La miscela di questi zuccheri metilati si poteva risolvere assai soddisfacentemente in 3 frazioni per mezzo dell'eluizione a gradiente con acqua-metiletilchetone da una colonna di carbone-celite (⁵) (Fig. 1). Le frazioni corrispondevano a quantità pressocchè

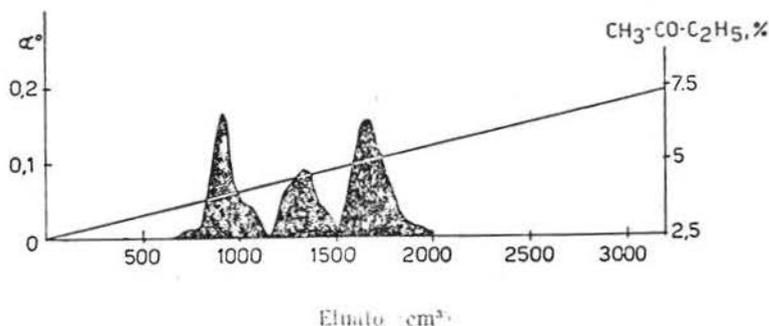


Fig. 1. - Separazione su carbone-celite dei prodotti di idrolisi acida del galattosil-lattosio metilato.

equimolecolari di 2,3,4-tri- O -metil-D-galattosio, 2,3,6-tri- O -metil-D-glucosio e 2,3,4,6-tetra- O -metil-D-galattosio. Gli esosi metilati si identificavano in base al potere rotatorio, alla mobilità cromatografica su carta ed al punto di fusione dei loro prodotti di condensazione con anilina.

I valori debolmente positivi del potere rotatorio del trisaccaride e dei due oligosaccaridi ottenuti da esso per idrolisi acida parziale, suggerivano la configurazione β per entrambi i legami galattosidici. La configurazione β del nuovo legame galattosidico presente nel galattosil-lattosio si poteva anche predire sulla base di quanto è stato generalmente osservato nelle reazioni enzimatiche di transgalattosilazione: il residuo del carboidrato trasferito, cioè, conserva il legame anomero inizialmente presente nello zucchero che serve da substrato. Un'ulteriore indicazione a favore della configurazione β si otteneva dal valore della rotazione ottica molare del trisaccaride (+18360), valore assai più basso di quello che si può calcolare per un galattosil-lattosio con legame α -1,6 (+56920) sommando la rotazione molare del lattosio (+17920) all'in-

cremento (+ 39000), ormai largamente accettato (6), che si osserva nell'unione di un residuo α -D-galattopiranosidico a vari zuccheri. La configurazione dei legami glucosidici era infine confermata anche dallo spettro infrarosso (in Nujol) del trisaccaride registrato fra 700 e 1000 cm^{-1} , intervallo ove compaiono le frequenze più caratteristiche dei carboidrati (7). Sono infatti stati osservati i picchi tipici dei legami β (779 e 900 cm^{-1}), mentre nella regione ove i legami α danno luogo a picchi ben definiti (800-850 cm^{-1}) è stato notato un ampio minimo.

Tutti i risultati ottenuti, dunque, portano a concludere che il galattosil-lattosio sintetizzato per azione di estratti di colture di *P. chrysogenum* sul lattosio sia il 6-O- β -D-galattopiranosil-(1-6)-O- β -D-galattopiranosil-(1-4)-D-glucopiranosio.

Una struttura identica era stata suggerita da PAZUR per il trisaccaride principale formato durante l'idrolisi del lattosio ad opera di lieviti capaci di fermentare il lattosio (8), ma fino ad ora non è stata pubblicata nessuna prova chimica al riguardo. WALLENFELS e coll. (9) avevano anche osservato la formazione di galattosil-lattosio ('lattotriosio') durante l'incubazione del lattosio con la β -galattosidasi di *Escherichia coli*, *Aspergilli*, *Helix pomatia* ed intestino di vitello, ma solo nel caso degli *Aspergilli* era stato isolato un trisaccaride analiticamente puro (10); poichè, però, per questa sostanza non sono state pubblicate le costanti chimico-fisiche, non è possibile accertare se esso possieda o meno struttura identica a quella ora assegnata al galattosil-lattosio sintetizzato dal *P. chrysogenum*.

I risultati di questo studio chimico, insieme con l'osservazione riportata in un precedente lavoro (1) che il galattosil-lattosio prodotto dal *P. chrysogenum* rappresenta l'oligosaccaride quantitativamente più importante ed il primo in ordine di tempo sintetizzato dalla muffa durante l'idrolisi del lattosio, indicano che la formazione di legami β -1,6-galattosidici è favorita in questa reazione enzimatica. A tal proposito va ricordato che anche nel caso di altre transferasi di funghi è stato osservato un preferenziale trasferimento ad opera dell'enzima del residuo non riducente dei disaccaridi sull'ossidrilico alcoolico primario degli accettori (11).

PARTE SPERIMENTALE

I punti di fusione non sono stati corretti. Le cromatografie su carta sono state eseguite su carta Whatman 1, con sviluppo discendente e impiegando i seguenti solventi:

- 1) alcool butilico normale-piridina-acqua (6:4:3);

- 2) alcool butilico normale-acido formico 98%-acqua (4:1,8:4);
- 3) alcool butilico normale saturato con acqua;
- 4) alcool butilico normale-acido acetico-acqua (4:1:5, fase superiore);
- 5) alcool butilico normale-alcool etilico-ammoniaca ($d=0,92$)-acqua (40:10:1:49, fase superiore).

Gli zuccheri venivano individuati mediante il reattivo benzidina-acido tricloroacetico (¹²), l'acido gluconico con bleu di bromofenolo in alcool etilico (0,04%).

ISOLAMENTO DEL GALATTOSIL-LATTOSIO. — Questo composto veniva preparato mediante il procedimento descritto in dettaglio in un altro lavoro (³), nel quale sono contenuti anche i dati che dimostrano l'identità del trisaccaride isolato dai filtrati di colture di *P. chrysogenum* sviluppato in terreni contenenti lattosio con il trisaccaride isolato da soluzioni di lattosio incubate con estratti della muffa. Dopo cromatografia su colonna le frazioni contenenti il trisaccaride si evaporavano sotto vuoto, si riprendevano con poco alcool metilico bollente, si riscaldavano con carbone attivo, si filtravano a caldo. Alla soluzione calda si aggiungeva acetone bollente fino a comparsa d'intorbidamento. Dopo due giorni di riposo a 5° il precipitato bianco formatosi si raccoglieva per centrifugazione, si lavava varie volte con acetone freddo e si seccava a temperatura ambiente sotto vuoto. Il materiale aveva $[\alpha]_D^{20} = 34^\circ$ ($c = 1$, in acqua) e fondeva a 187°, cominciando ad alterarsi a 167°. All'analisi dava:

	trov. % :	C 39,66; H 6,70;
per $C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 2H_2O$	calc. :	40,00; 6,71.

Il peso molecolare determinato mediante ossidazione con ipiodito (¹³) dava:

	trov. % :	peso molecolare 560;
per $C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 2H_2O$	calc. :	540.

Una conferma del valore del peso molecolare si otteneva per via spettrofotometrica, confrontando l'assorbimento di una soluzione etilalcolica dell'osazone del trisaccaride con quella di una soluzione etilalcoo-

lica di glucosazone (Fig. 2). Gli osazoni si preparavano secondo i metodi usuali; quello del trisaccaride, dopo cristallizzazione da alcool etilico diluito, si presentava in lunghi aghi con p.f. 229-231°.

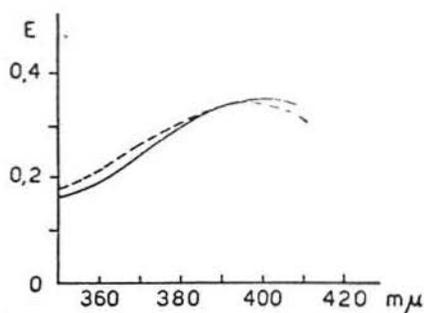


Fig. 2. - Spettri u.v. di soluzioni etilalcoliche (2×10^{-5} M) di glucosazone (.....) e galattosil-lattosazone (—).

IDROLISI TOTALE. — Milligrammi 5 di trisaccaride si riscaldavano 2 ore con $0,5 \text{ cm}^3$ di acido solforico N in tubo chiuso a 110° . Dopo raffreddamento la soluzione si neutralizzava con resina Amberlite IRA-400 e si esaminava mediante cromatografia su carta. Dai cromatogrammi (solvente 1) si eluivano con acqua i monosaccaridi e si dosavano con il micrometodo di NELSON ⁽¹⁶⁾. Il dosaggio dava:

$$\begin{array}{l} \text{trov. } \frac{\text{glucosio}}{\text{galattosio}} : 1,8; \\ \text{per galattosil-lattosio calc.} : 2,0. \end{array}$$

IDROLISI PARZIALE. — Milligrammi 5 di trisaccaride si riscaldavano 9 ore con 25 cm^3 di acido acetico 2N in tubo chiuso a 110° . La cromatografia su carta (solvente 1) indicava la presenza di glucosio, galattosio, lattosio e 6-O- β -D-galattopiranosil-D-galattosio ⁽³⁾. Dopo allontanamento dell'acido acetico a pressione ridotta ed a temperatura inferiore a 35° , la soluzione si neutralizzava con resina Amberlite IR-4B e si frazionava poi su colonna di carbone-celite impiegando per l'eluizione un gradiente di concentrazione di alcool etilico in acqua ⁽³⁾. E' stata usata una colonna con diametro di cm 3 e altezza di cm 38, un miscelatore contenente cm^3 500 di alcool etilico 5% ed una riserva con cm^3 1000 di alcool etilico al 30%.

Venivano raccolte frazioni di cm^3 6 mediante un collettore automatico. La cromatografia su carta (solvente 1) delle singole frazioni dimostrava una parziale separazione dei due disaccaridi (Fig. 3). Questi si isolavano evaporando sotto vuoto le frazioni omogenee e si purificavano ulteriormente per mezzo della cromatografia su carta con il solvente 1.

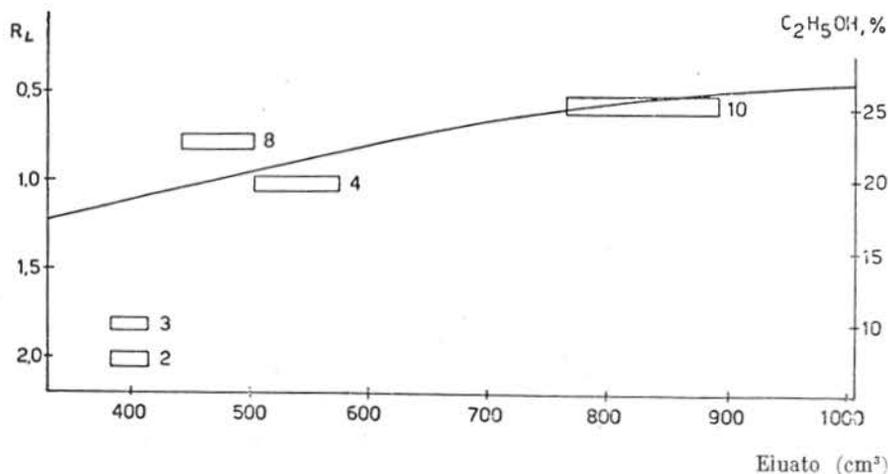


Fig. 3. - Frazionamento su carbone-celite degli zuccheri ottenuti per idrolisi parziale del galattosil-lattosio. R_L è il rapporto fra il cammino percorso nelle cromatografie su carta (solvente 1) da ogni singola sostanza e quello percorso dal lattosio. I numeri assegnati agli zuccheri sono gli stessi usati in un precedente lavoro (3) e cioè: 2 per il glucosio, 3 per il galattosio, 4 per il lattosio, 8 per il 6-O- β -D-galattopiranosil-D-galattosio, 10 per il galattosil-lattosio.

La tabella I mostra che le mobilità cromatografiche (solvente 1 e 4) dei disaccaridi così ottenuti sono identiche a quelle del lattosio e del 6-O- β -D-galattopiranosil-D-galattosio (quest'ultimo gentilmente fornito dal Dr. Lindberg). I prodotti avevano rispettivamente $[\alpha]_D^{24} + 52,0^\circ$ ($c=1$, in acqua) ($[\alpha]_D^{24}$ del lattosio è $+52,4^\circ$), e $[\alpha]_D^{24} + 29,3^\circ$ ($c=1$ in acqua) (BOUVENG e LINDBERG (17) danno per il 6-O- β -D-galattopiranosil-D-galattosio $[\alpha]_D^{20}$ pari a $+30^\circ$).

TABELLA I

Confronto delle mobilità cromatografiche (R_L) (*) dei disaccaridi ottenuti per idrolisi parziale del galattosil-lattosio con quelle del 6-O- β -D-galattopiranosil-D-galattosio e del lattosio.

Composto	Solvente 1	Solvente 4
Disaccaridi ottenuti nell'idrolisi parziale del galattosil-lattosio	0,68 ; 1,00	0,72 ; 1,00
6-O- β -D-galattopiranosil-D-galattosio	0,68	0,72
Lattosio	1,00	1,00

(*) Rapporto fra il cammino percorso da ogni singola sostanza e quello percorso dal lattosio.

OSSIDAZIONE CON IPOIODITO. — Il trisaccaride (mg 10 in cm³ 1 di acqua), iodio (mg 6) e idrato di potassio N (cm³ 0,08) venivano tenuti 14 ore a temperatura ambiente. La soluzione (pH 7,5) si acidificava con acido solforico 10N (cm³ 0,15) e si riscaldava 2 ore a 110° in tubo chiuso. La soluzione limpida, ottenuta dopo estrazione dello iodio con tetracloruro di carbonio, neutralizzazione con carbonato di bario e centrifugazione, si esaminava mediante cromatografia su carta; con il solvente 1 si poteva dimostrare la presenza di un nuovo zucchero riducente che corrispondeva al galattosio, mentre con il solvente 2 si poteva anche rilevare la presenza di acido gluconico.

METILAZIONE. — Il trisaccaride (g 1,5) veniva metilato due volte consecutive con solfato dimetilico e due volte con i reattivi di Purdie nelle condizioni descritte da KUHN e coll. (14), con la sola differenza che nel secondo trattamento con solfato dimetilico la miscela si teneva per 4 ore a 40-50°. Il prodotto finale era uno sciroppo non riducente.

IDROLISI E FRAZIONAMENTO DEL GALATTOSIL-LATTOSIO METILATO. — Lo sciroppo (g 0,37) si idrolizzava nelle condizioni descritte da WHISTLER e CONRAD (18) e l'idrolizzato si frazionava su colonna di carbone-celite, usando per l'eluizione un gradiente lineare di concentrazione (da 2,5 a 10%) di metiletilchetone in acqua (5). Si ottenevano tre picchi ben separati (Fig. 1), ciascuno dei quali, in base ai risultati delle cromatografie su carta eseguite con i solventi 3, 4 e 5, conteneva un singolo prodotto. Il confronto cromatografico con campioni di metilesosi indicava che il primo picco conteneva 2,3,4-tri-O-metil-D-galattosio, il secondo 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosio ed il terzo 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galattosio (tabella II). I prodotti contenuti nei tre picchi venivano sottoposti ad ul-

TABELLA II

Confronto delle mobilità cromatografiche (RL) (*) di alcuni metilesosi con quella degli zuccheri ottenuti per idrolisi acida del galattosil-lattosio metilato.

Composto	Solvente 3	Solvente 4	Solvente 5
Metilesosio del primo picco	0,71	0,62	0,58
2,3,4-tri-O-metil-D-galattosio	0,71	0,61	0,58
Metilesosio del secondo picco	0,78	0,69	0,70
2,3,6-tri-O-metil-D-glucosio	0,80	0,70	0,72
Metilesosio del terzo picco	0,84	0,74	0,78
2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galattosio	0,84	0,73	0,77

(*) Rapporto fra il cammino percorso da ogni singola sostanza e quello percorso dal lattosio.

teriore controllo nel modo seguente. Il prodotto isolato dal primo picco, dopo evaporazione sotto vuoto fino a secchezza, aveva $[\alpha]_D^{27} + 111^\circ$ ($c=0,2$ in acqua) e per ebollizione di 5 ore con anilina in soluzione etilalcolica dava 2,3,4-tri-O-metil-N-fenil-D-galattosilammina con p.f. 163° (non depresso in miscela con un campione autentico ottenuto dal Dr. Lindberg). Inoltre il prodotto presente nel primo picco dava luogo a formaldeide (identificata colorimetricamente con acido cromotropico) per ossidazione con periodato. Il residuo ottenuto per evaporazione del secondo picco aveva $[\alpha]_D^{25} + 70^\circ$ ($c=0,3$ in acqua); l'attività ottica di una sua soluzione all'1% in alcool metilico contenente il 2% di acido cloridrico diminuiva fortemente a temperatura ambiente. Queste proprietà sono caratteristiche del 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosio. Lo sciroppo isolato dal terzo picco aveva $[\alpha]_D^{25} + 115^\circ$ ($c=0,43$ in acqua) e dava luogo per ebollizione con una soluzione etilalcolica di anilina ad un composto che fondeva a 187° ed il cui p.f. non era depresso in miscela con un campione di 2,3,4,6-tetra-O-metil-N-fenil-D-galattosilammina (gentilmente fornito dal Dr. P. W. Kent).

I rapporti molecolari dei tre metil-aldosi si potevano calcolare dai valori del potere rotatorio dei tre picchi ottenuti dalla colonna; applicando al calcolo i valori di $[\alpha]_D$ riportati in letteratura per il 2,3,6-tri-O-metil-D-galattosio, per il 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosio e per il 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galattosio si ottenevano valori in ottimo accordo con quelli corrispondenti ad una miscela equimolecolare dei tre composti.

Ringraziamo il Doz. Dr. H. J. Bielig, dell'Istituto Max-Planck di Heidelberg - Germania, il Prof. E. L. Hirst, dell'Università d'Edimburgo - Gran Bretagna, il Dr. P. W. Kent dell'Università d'Oxford - Gran Bretagna ed il Dr. B. Lindberg del Politecnico di Stoccolma - Svezia, per avere fornito campioni di zuccheri non reperibili in commercio.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BALLIO A., CHAIN E. B. e DENTICE DI ACCADIA F. - Rend. Ist. sup. Sanità, 18: 1183 (1933).
- (²) BALLIO A. e RUSSI S. - Boll. Soc. ital. Biol. sper., 33: 1748 (1957).
- (³) BALLIO A. e RUSSI S. - J. Chromatography, 4: 417 (1960).
- (⁴) WHISTLER R. L. e DURSO D. F. - J. am. chem. Soc., 72: 677 (1950).
- (⁵) LINDBERG B. e WICKBERG B. - Acta chem. scand., 8: 369 (1954).
- (⁶) FRENCH D. - Advanc. in Carbohydrate Chem., 9: 160 (1954).

- (7) BARKER S. A., BOURNE E. J. e WHIFFEN D. H. - *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. III, p. 213. Academic Press, New York (1956).
- (8) PAZUR J. H. - *Science*, 447: 355 (1953); *J. biol. Chem.*, 202: 439 (1954).
- (9) WALLENFELS K., BERNT E. e LIMBERG G. - *Liebigs Ann.*, 584: 63 (1953).
- (10) WALLENFELS K., BERNT E. e LIMBERG G. - *Liebigs Ann.*, 579: 113 (1953).
- (11) PAN S. C., NICHOLSON L. W. e KOLACHOV P. - *J. am. chem. Soc.*, 73: 2547 (1951); *Arch. Biochem. Biophys.*, 42: 406 (1953); PAZUR J. H. e FRENCH D. - *J. am. chem. Soc.*, 73: 3536 (1951); *J. biol. Chem.*, 196: 265 (1952); BACON J. S. D. e BELL D. J. - *J. chem. Soc.*, 2528 (1953); BELL D. J. e EDELMAN J. - *Ibid.* 4652 (1954); ALBON N., BELL D. J., BLANCHARD P. H., GROSS D. e RUNDRELL J. R. - *Ibid.* 24 (1953); GROSS D., BLANCHARD P. H. e BELL D. J. - *Ibid.* 4727 (1954); BARKER S. A. e CARRINGTON T. R. - *Ibid.* 3588 (1953); BARKER S. A., BOURNE E. J. e CARRINGTON T. R. - *Ibid.* 2125 (1954); BARKER S. A., BOURNE E. J., HERVITT G. C. e STACEY M. - *Ibid.* 3734 (1955); BARKER S. A., BOURNE E. J. e THEANDER O. - *Ibid.* 2064 (1957); SAROJA K., VENKATARAMAN R. e GIRI K. V. - *Biochem. J.*, 60: 399 (1955); BALLIO A. e RUSSI S. *Gazz. chim. ital.*, 86: 476 (1956); CROOK E. M. e STONE B. A. - *Biochem. J.*, 63: 1 (1957).
- (12) BACON J. S. D. e EDELMAN J. - *Biochem. J.*, 48: 114 (1954).
- (13) WILLSTÄTTER R. e SCHUDEL G. - *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 51: 780 (1918).
- (14) KUHN R., BAER H. H. e GAUHE A. - *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 88: 1135 (1955).
- (15) BARRY V. C., MCCORMIK J. E. e MITCHELL P. W. D. - *J. chem. Soc.*, 222 (1955).
- (16) NELSON N. - *J. biol. Chem.*, 153: 373 (1944).
- (17) BOUVENG H. e LINDBERG B. - *Acta chem. scand.*, 10: 4515 (1956).
- (18) WHISTLER R. L. e CONRAD H. E. - *J. am. chem. Soc.*, 76: 1673 (1954).
-

104. B. FRATELLO e G. SERMONTI. — Sul meccanismo della segregazione mitotica in *Aspergillus nidulans*.

Riassunto. — La vitalità del cromosoma ricombinante nei segreganti sub-cromosomici da diploidi di *Aspergillus* non è significativamente ridotta rispetto a quella dell'omologo parentale. Quest'osservazione avvalorava l'ipotesi del *crossing-over* mitotico come meccanismo generale della segregazione sub-cromosomica in *Aspergillus*.

Summary. — The viability of the recombinant chromosome in sub-chromosomal segregants of *Aspergillus nidulans* is not reduced compared with that of the parental homologue. This supports the hypothesis that crossing-over is the general mechanism of sub-chromosomal segregation in *Aspergillus*.

Tutti i dati raccolti sinora sulla segregazione somatica sub-cromosomica in diploidi di *Aspergillus nidulans* indicano concordemente il *crossing-over* mitotico come causa di tale processo. Le prove portate sono di varia natura; la più decisiva è il recupero dei prodotti complementari del *crossing-over* mitotico in cloni diploidi segreganti, ottenuto da ROPER e PRITCHARD (1) e da PRITCHARD (2). L'isolamento di un segregante che porti due cromosomi *crossing-over* complementari, cioè gli stessi alleli del diploide originale ma in diversa combinazione, è stato possibile facendo uso dell'effetto di posizione tra pseudo-alleli. Il particolare tipo di selezione adottato, benchè comprovi definitivamente l'occorrenza del *crossing-over* mitotico nelle muffe diploidi, non permette di stabilire se questo è il meccanismo generale della segregazione somatica sub-cromosomica o solo un caso particolare. La ricombinazione tra pseudo-alleli non può avvenire che per *crossing-over*, ma la segregazione somatica sub-cromosomica può essere il risultato di vari processi. Essa può derivare da translocazioni somatiche [JONES (2)] o da *crossing-overs* ineguali. Tali meccanismi possono essere supposti a maggior ragione per la segregazione somatica indotta da agenti mutageni [FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (4)].

La translocazione somatica, specie se tra cromosomi non omologhi, produce ampi squilibri nel genoma dei nuclei derivati, come conseguenza di vaste duplicazioni e delezioni, e pertanto si può prevedere che essa genererebbe prodotti letali, mentre il *crossing-over* ineguale produrreb-

Bovini adulti vaccinati col monovalente "C."	N. d'ordine	N. di matricola	Età	Titolo degli anticorpi (*)			Titolo anticorpi nei giorni successivi all'												
				Prima della vacci- nazione	Dopo 50 gg. dalla vacci- nazione	Il giorno preced. l'infe- zione	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13	15	17	
2 mesi dopo vaccinazione	1	1660	5 anni circa	<4	16	16	16	8	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	2	1974	" " "	<4	16	16	16	16	16	32	64	64	64	64	64	64	64	64	64
	3	2879	" " "	<4	64	64	64	64	64	128	128	128	64	64	64	128	64	64	64
	4	1928	" " "	<4	16	16	16	8	16	16	32	32	32	32	32	64	64	64	64
	5	2637	4 " "	<4	4	4	4	8	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16
	6	448	" " "	<4	8	8	8	8	8	16	16	16	32	32	32	64	64	64	64
3 mesi dopo	1	2179	5 anni circa	<4	16	16	16	16	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	2	334	" " "	<4	8	<4	4	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16
	3	3521	" " "	<4	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16	32	32
	4	2219	3 " "	<4	32	32	32	16	32	32	32	64	64	64	64	64	64	64	64
4 mesi dopo	1	1997	5 anni circa	<4	8	<4	4	4	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16
	2	3831	4 " "	<4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	16	8	8	8	8
	3	1967	" " "	<4	8	8	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16
5 mesi dopo	1	2821	4 anni circa	<4	4	4	4	8	16	16	16	32	32	32	32	32	32	32	32
	2	1760	" " "	<4	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	3	1752	5 " "	<4	32	16	16	16	32	32	32	32	32	32	64	64	64	64	64
	4	1892	" " "	<4	8	8	8	8	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
6 mesi dopo	1	631	4 anni circa	<4	16	<4	<4	<4	4	8	16	16	32	32	32	32	64	64	64
	2	640	" " "	<4	<4	4	<4	<4	<4	4	16	16	32	32	32	32	64	64	64
7 mesi dopo	1	2729	6 anni circa	<4	8	8	4	8	8	8	16	16	—	16	32	32	32	32	64
	2	1271	" " "	<4	16	16	16	16	32	16	32	32	32	32	32	64	64	64	64
	3	1937	" " "	<4	32	32	16	16	32	32	64	64	64	64	128	128	128	128	128
8 mesi dopo	1	3185	5 anni circa	<4	8	4	4	4	8	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16
	2	2246	4 " "	<4	<4	<4	<4	<4	8	8	8	16	16	16	16	32	32	32	32
	3	3149	" " "	<4	<4	<4	<4	<4	4	4	4	8	8	8	32	32	32	32	32
9 mesi dopo	1	2954	5 anni circa	<4	4	4	4	4	8	8	8	8	8	8	8	8	4	8	8
	2	2761	" " "	<4	8	8	8	8	16	8	16	—	16	16	16	32	32	32	32
10 mesi dopo	1	2641	7 anni circa	<4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	2	2509	6 " "	<4	16	16	16	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
11 mesi dopo	1	790	5 anni circa	<4	16	16	16	32	16	32	32	64	64	64	64	64	64	64	64
	2	2512	4 " "	<4	16	<4	<4	4	4	8	8	8	32	32	32	32	32	32	32
12 mesi dopo	1	2047	4 anni circa	<4	32	16	16	8	16	32	32	32	32	32	32	64	64	64	64
	2	778	3 " "	<4	16	16	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
13 mesi dopo	1	2825	4 anni circa	<4	4	4	4	4	8	8	16	16	32	32	32	32	32	32	32
	2	1888	" " "	<4	4	<4	<4	<4	4	4	8	8	16	16	16	16	16	16	16
14 mesi dopo	1	3004	4 anni circa	<4	16	16	16	16	8	16	32	—	64	64	64	128	128	128	128
	2	2725	" " "	<4	<4	<4	<4	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32

(*) Il titolo di siero-neutralizzazione è espresso col valore reciproco della diluizione del siero che neutralizza circa 100 DCP.

bovini vaccinati con monovalente «C» e nei bovini controllo.

corpi nei giorni successivi alla prova d'infezione (*)														Lesioni aftose boccali	Generalizzazione	Temperatura	Bovini controllo		
9	11	13	15	17	19	20	22	24	26	28	30	32	34				Bovini n.	Titolo anticorpi il giorno precedente all'infezione (*)	Lesioni aftose boccali
32	32	32	32	32	32														
64	64	64	64	64	64														
64	64	128	64	64	64														
32	32	64	64	64	64														
16	16	16	16	16	16	32	32	32	32	32	32	32	32		20	tutti <4	tutti +++		
32	32	64	64	64	32	64	64												
32	32	32	32	32	32														
16	16	16	16	16	16														
16	16	16	16	32	32														
64	64	64	64	64	64	64	64	32	32	32	32				25	tutti <4	tutti +++		
16	16	16	16	16	16	16													
8	16	8	8	8	8	8													
16	16	16	16	16	16	16									20	tutti <4	tutti +++		
32	32	32	32	32	32														
16	16	16	16	16	16														
32	64	64	64	64	64														
8	8	8	8	8	8										20	tutti <4	tutti +++		
32	32	32	64	64	64	128	128	123	64	64	64	64	64						
32																			
16	32	32	32	64	64	64	64	64											
32	32	64	64	64	64	64	64												
64	128	128	128	128	128	128	128	128	177	177	128	128			20	tutti <4	tutti +++		
16	16	16	16	16	16														
16	16	16	32	32	32														
8	8	32	32	32	32										20	tutti <4	tutti +++		
8	8	8	4	8	8	8	8	8	8	8									
16	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32					20	tutti <4	tutti +++		
8	8	8	8	8	8	8	8	8											
32	32	32	32	32	32	32	8	8											
64	64	64																	
32	32	32																	
32	32	64	64	64															
32	32	32																	
32	32	32	32	32	32														
16	16	16	16	16											20	tutti <4	tutti +++		
64	64	128	128	128	128	128	128	128	128	128									
16	16	16	32	32	64	64	64	64	64										

neutralizza circa 100 DCP₅₀ di virus «C».

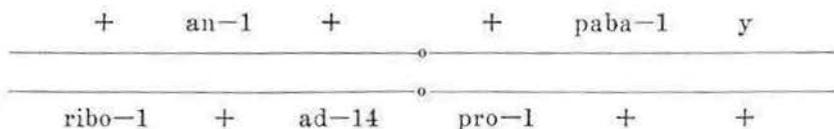
be, nel nucleo segregante, una breve delezione o la duplicazione di un breve tratto cromatidico che non dovrebbe influenzare la vitalità del nucleo diploide che rechi l'aberrazione allo stato eterozigote. La vitalità del risultante cromosoma ricombinante, portato allo stato aploide, verrebbe però ad essere ridotta o addirittura annullata. L'occorrenza di questo meccanismo alla base della segregazione somatica sub-cromosomica può essere saggiata esaminando il genotipo dei ceppi segreganti diploidi (sub-cromosomici), ed in particolare comparando la vitalità del cromosoma ricombinante con quella dell'omologo parentale.

PONTECORVO (3) e PONTECORVO e KÄFER (7) hanno esaminato il genotipo di numerosi segreganti sub-cromosomici, regolarmente reperiendo tutti i marcatori localizzati sul cromosoma ricombinante, in segreganti aploidi di secondo ordine. Tuttavia questo esame non è stato condotto su una base quantitativa, e non è stato osservato se la probabilità di reperire tra i segreganti aploidi di secondo ordine il cromosoma ricombinante e l'omologo parentale fosse la stessa.

Il presente lavoro è stato condotto per saggiare questa eventualità. Sono stati impiegati, per l'esame della segregazione aploide di secondo ordine, sia segreganti sub-cromosomici spontanei che segreganti sub-cromosomici ottenuti su agar contenente formalina [FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (4)].

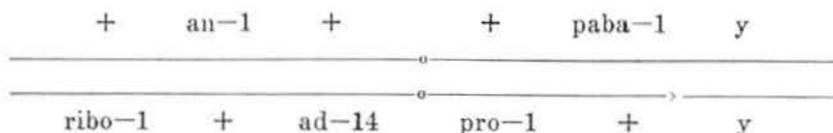
MATERIALI E METODI

E' stato preparato un diploide eterozigote (M) il cui primo cromosoma era marcato in ambo i membri su tutte e due le braccia, con i seguenti marcatori:



Il diploide era inoltre eterozigote per il gene *w-3/+* (II cromosoma), *mc-1/+* (IV cromosoma) e *nic-2/+* (V cromosoma). Il significato dei simboli è quello adottato da PONTECORVO e KÄFER (7). I marcatori su ambo le braccia dei due membri del primo cromosoma permettono di distinguere la segregazione dell'intero cromosoma (per aploidizzazione o non-disgiunzione) da quella di un segmento cromosomico (per *crossing-over* o translocazione); l'aploidizzazione è inoltre suffragata dalla segregazione dei marcatori su altri cromosomi.

Dopo la segregazione somatica del marcatore *y* il cromosoma I si presenta come segue:



Il segno × indica il punto di « scambio », che può essere il luogo del *crossing-over* somatico o il punto di congiunzione di due rotture non precisamente corrispondenti. Ciò è appunto quello che ci si propone di accertare.

ISOLAMENTO DI SEGREGANTI SOMATICI. — I segreganti gialli « spontanei » sono stati isolati sulla superficie di diverse colonie del diploide M, con un ago sterile, come singole teste o minute macchioline gialle (gli AA. desiderano ringraziare la D.ssa Arditti che ha eseguito i prelievi). Per evitare che nei cloni segreganti attraverso successivi trasferimenti eventuali genotipi sbilanciati fossero rimpiazzati da altri genotipi per processi selettivi, alcuni dei segreganti gialli sono stati sottoposti ad un unico passaggio su terreno completo prima del saggio.

I segreganti gialli indotti da formalina sono stati prelevati come settori da colonie sviluppate su agar completo contenente una dose di formalina (0,03%) che induce un aumento di circa 3 volte del numero dei segreganti sub-cromosomici [FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (4)].

I segreganti aploidi (o non disgiunzionali) di secondo ordine sono stati ottenuti trattando i segreganti gialli di primo ordine con dosi di formalina (0,04-0,05%) che aumentano elettivamente questi processi [FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (4)] e isolando una trentina di settori bianchi dalle colonie sopravvissute. Di regola la maggior parte di questi risultarono aploidi, benchè in qualche caso il numero di segreganti bianchi diploidi di secondo ordine sia risultato inaspettatamente alto.

CLASSIFICAZIONE DEI SEGREGANTI. — La caratterizzazione dei segreganti rispetto alle richieste nutrizionali è stata compiuta con le tecniche generalmente adottate nel nostro laboratorio [FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (4)].

RISULTATI

A) VITALITA' RELATIVA DEI DUE MEMBRI DEL I CROMOSOMA NEL DIPLOIDE M. — Mediante piastramento su agar completo con formalina (0,03%) è stata indotta la segregazione somatica del diploide M. I segreganti

bianchi portanti marcatori del primo cromosoma sono stati raggruppati in due categorie, a seconda del membro del primo cromosoma di cui portavano i marcatori (Tab. I). Gli altri marcatori nutrizionali segregavano secondo l'attesa e non sono menzionati nella Tab. I. La vitabilità dei due membri risulta uguale.

Tab. I. - Segreganti bianchi (*w*) dal diploide eterozigote M, portanti marcatori del primo cromosoma.

Genotipo (*)	Frequenza dei segreganti		Totale
	Esperimento 1	Esperimento 2	
<i>w (y)</i> an paba	11	10	21
<i>w</i> ad pro ribo	10	12	22

(*) I marcatori *me-1* e *nic-2* non sono menzionati. *y* è epistatico a *w-3* e non espresso fenotipicamente.

B) ESAME DEL GENOTIPO DEI SEGREGANTI *y/y* SPONTANEI. — Da ognuno di una dozzina di segreganti *y/y* spontanei sono stati indotti (con HCHO) segreganti di secondo ordine bianchi. Quelli portanti i marcatori dell'uno o dell'altro membro del I cromosoma sono stati distinti in due gruppi a seconda del cromosoma presente. I dati così raccolti sono riportati nella Tab. II, dove non è menzionata la parte del fenotipo relati-

Tab. II. - Segreganti di secondo ordine bianchi (*w*) da segreganti gialli (*y*) prototrofi di primo ordine del diploide M, portanti marcatori del primo cromosoma.

Segreganti di I ordine (codice) (**)	Frequenza dei segreganti di II ordine												TOT
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Genotipo (*)													
<i>w (y)</i> ad pro ribo	9	10	8	6	^(o) 7	^(o) 13	9	10	2	10	8	16	108
<i>w (y)</i> an paba .	6	8	10	13	11	16	7	14	15	4	9	20	132
X ² (ipotesi nulla)				2.6	0.9				9.6	2.5			2.3
P				0.1	0.3				<0.01	0.1			0.1

(*) Vedi nota alla Tab. I.

(**) I segreganti 9, 10, 11 e 12 sono stati analizzati dopo un unico passaggio su terreno completo.

(^o) Sporificazione povera su terreno completo.

va ai marcatori *me-1* e *nic-2* che non ha rilievo ai fini della presente ricerca.

Nella quasi totalità dei segreganti il rapporto tra le frequenze di reperimento dei due cromosomi non risulta significativamente diverso da 1:1. Solo nel segregante 9 la differenza è significativa e il cromosoma ricombinante portante *ribo-1 ad-14* e *pro-1* è in gran difetto. E' da notare che dallo stesso diploide sono stati ottenuti 3 segreganti portanti marcatori da ambo i membri del I cromosoma; è pertanto possibile che i due segreganti *w-3 (y) ribo-1 ad-14 pro-1* derivino, come i tre suddetti, da ricombinazione secondaria, cioè non dal processo primario che ha determinato la segregazione somatica, quest'ultimo essendo stato probabilmente accompagnato da un effetto letale. Da altri due segreganti, il 5 ed il 6, nei quali la minor frequenza del I cromosoma ricombinante non è significativa, tutti i segreganti bianchi di secondo ordine portanti *ad-14 pro-1 ribo-1* presentavano sporificazione limitata alla periferia delle colonie. Questa alterazione è insorta, verisimilmente, parallelamente alla ricombinazione somatica, forse come conseguenza di questa.

C) ESAME DEL GENOTIPO DEI SEGREGANTI *y/y* INDOTTI DA FORMALINA. — Uno solo, tra dieci esaminati, presenta una significativa dissimmetria nella segregazione di secondo ordine, che peraltro è a spese del I cromosoma parentale (Tab. III). La situazione sembra pertanto la stessa che si osserva per segreganti spontanei.

Tab. III. - Segreganti di secondo ordine bianchi (*w*) da segreganti gialli (*y*) prototrofi del diploide M indotti da formalina, portanti marcatori del primo cromosoma.

Segreganti di I ordine (codice)	Frequenza dei segreganti di II ordine										TOT	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Genotipo (*)												
<i>w (y) ad pro ribo</i>	6	10	9	16	6	8	7	8	17	13	100	
<i>w (y) an paba</i>	9	10	7	13	7	9	3	7	10	6	75	
X ² (ipotesi nulla)							1.6		1.8	14.5	3.5	
P							0.5		0.1	<0.01	0.05	

(*) Vedi nota alla Tab. I.

CONCLUSIONI

Le osservazioni riportate portano alla conclusione che la ricombinazione somatica sub-cromosomica non produce, in genere, una alterazione significativa della vitalità del cromosoma ricombinante, come ci si attenderebbe se la ricombinazione avvenisse per un processo di translocazione o addirittura di delezione cromosomica. In un caso, su una ventina di segreganti esaminati, il cromosoma ricombinante presentava vitalità ridotta o forse nulla. Peraltro in uno dei segreganti indotti da formalina è il cromosoma omologo al ricombinante che risulta svantaggiato. Questi fenomeni possono essere il risultato di fortuite coincidenze.

Il *crossing-over* mitotico, per quanto si può dedurre dalla stima della vitalità del cromosoma ricombinante, rimane l'interpretazione più plausibile e risulterebbe il meccanismo generale nella segregazione somatica sub-cromosomica in *Aspergillus*. Ciò non esclude la rara occorrenza di altri processi, la cui individuazione richiederà però particolari accorgimenti selettivi per esser fatta su più larga scala; ciò solo potrà consentire di valutare se la ridotta vitalità del cromosoma ricombinante in alcuni segreganti è dovuta al processo stesso della ricombinazione o a semplice coincidenza di due processi indipendenti. Nel primo caso l'intera questione potrebbe essere risolta, se cioè lo scambio senza alterazione significativa di vitalità è un caso limite di un generale processo di translocazione, o un fenomeno completamente distinto.

Le conclusioni relative alla segregazione somatica indotta da formalina potrebbero ricalcare le precedenti. Una limitazione alla estensione delle considerazioni fatte deriva dalla difficoltà di stimare l'effettiva entità dell'incremento della segregazione sub-cromosomica ad opera della formalina [FRATELLO, MORPURGO e SERMONTI (4)]; ciò rende problematica la stima di quanti, tra i segreganti ottenuti in presenza di formalina, siano realmente « indotti » da questa.

Un definitivo chiarimento sulla natura della segregazione somatica sub-cromosomica in *Aspergillus nidulans*, potrà derivare soltanto dal regolare reperimento di macchie gemelle (*twin-spots*) segreganti complementari. I dati sinora raccolti sono comunque tutti in accordo con l'ipotesi del *crossing-over* mitotico, avanzata da PONTECORVO (5), sul modello del *crossing-over* mitotico in *Drosophila* [STERN (6)].

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ROPER J. A. e PRITCHARD R. H. - *Nature*, 175: 639 (1955).
- (²) PRITCHARD R. H. - *Heredity*, 9: 343 (1955).
- (³) JONES D. F. - *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24: 208 (1938).
- (⁴) FRATELLO B., MORPURGO G. e SERMONTI G. - *Genetics*, 45: 783 (1960).
- (⁵) PONTECORVO G., ROPER J. A., HEMMONS L. M., MAC DONALD e BUFTOF A. W. J. - *Adv. in Genetics*, 5: 141 (1953).
- (⁶) STERN C. - *Genetics*, 21: 623 (1936).
- (⁷) PONTECORVO G. e KÄFER E. - *Adv. in Genetics*, 9: 71 (1958).