

88. G. PENSO, P. MERUCCI, G. VICARI. — Studio dei fenomeni immunitari per mezzo delle colture di tessuto. — IX. Sull'azione citopatogena della O-Streptolisina.

Riassunto. — In una preparazione commerciale di O-Streptolisina, inattivata al calore, è stata identificata una spiccata attività citopatogena. Tale attività permane dopo dialisi, dopo contatto con colesterolo, dopo contatto con corrispondente antisiero di coniglio, ed è ancora presente nel supernatante se il complesso O-Streptolisina-antisiero di coniglio viene precipitato con siero di pollo antisiero di coniglio.

Il siero di conigli immunizzati con la O-Streptolisina inattivata al calore neutralizza ancora parzialmente l'azione emolitica della O-Streptolisina attiva.

Résumé. — On a identifié, dans une préparation commerciale de O-Streptolisine inactivée par la chaleur, une activité cytopathogène remarquable.

Cette activité disparaît après dialyse tandis qu'elle continue après contact avec le cholestérol, après trypsinisation et après contact avec un antisérum correspondant de lapin; elle est encore présente dans le surnageant si l'ensemble O-Streptolisine-antisérum de lapin est fait précipiter avec du sérum de poulet antisérum de lapin. Le sérum de lapins immunisés par O-Streptolisine inactivée par la chaleur, neutralise encore en partie l'action hémolytique de la O-streptolisine active.

Summary. — An outstanding cytopathogenic activity has been detected in a heat inactivated commercial preparation of O-Streptolysin.

The activity disappears after dialysis but remains after contact with cholesterol, trypsinisation or contact with the corresponding rabbit antiserum, and is still present in the supernatant if the O-Streptolysin-rabbit antiserum complex is precipitated with chick anti-rabbit-serum serum.

The serum of rabbits immunised against heat inactivated O-Streptolysin will still partially neutralise the haemolytic action of active O-streptolysin.

Zusammenfassung. — In einem Handelspräparate von O-Streptolysin wurde eine erhebliche zellpathogene Wirkung festgestellt. Dabei verschwindet die cytopathogene Wirkung nach Dialysierung; sie bleibt aber nach Trypsinierung und nach Kontakt mit Cholesterol bzw. mit entsprechendem Kaninchenantiserum da. Wird

der Komplex O-Streptolysin-Kaninchenantiserum durch Hühnerserum gegen Kaninchen präzipitiert, dann ist die Wirkung in der supernatanten Flüssigkeit immer noch vorhanden.

Serum von durch hitzeinaktiviertes O-Streptolysin immunisierten Kaninchen neutralisiert noch teilweise die hämolytische Wirkung des aktiven O-Streptolysins.

E' stata di recente da noi segnalata [PENSO e VICARI, 1937 ⁽¹⁾] l'azione citotossica, su cellule coltivate in vitro, di una preparazione commerciale di O-Streptolisina, dopo che il potere emolitico di essa era stato distrutto mediante riscaldamento. Ancora più di recente è stata comparativamente studiata la citotossicità di alcune tossine, e precisamente della alfa tossina stafilococcica e delle Streptolisine O ed S, mediante tecniche respirometriche e mediante tecniche citologiche su colture di cute sia di uomo, sia di cavia [LAWRENCE, 1939 ⁽²⁾]. Da queste ultime ricerche è risultato che la alfa tossina stafilococcica è estremamente tossica per le cellule della cute, meno tossica risulta l'azione della O-Streptolisina. Entrambi le tossine esercitano molto rapidamente la loro azione; e tale azione provoca l'inattivazione di meccanismi cellulari che producono lesioni irreversibili sulle cellule cutanee. L'aggiunta di antisiero specifico dopo 60 minuti dall'addizione al terreno di coltura della tossina in esame non arresta la distruzione delle cellule, mentre realizza una protezione parziale se viene effettuata prima di questo tempo, e completa, se tossina ed antitossina vengono aggiunte contemporaneamente alla coltura di cellule.

Da altre ricerche risulta [SERVI, PAOLUZZI, BARBIERI, 1937 ⁽³⁾] che la attività letale della O-Streptolisina sul ratto viene ridotta, ma non abolita, quando si inietti della O-Streptolisina il cui potere emolitico sia stato previamente inattivato al calore; l'iniezione di questa tossina per via venosa provoca lesioni degenerative a localizzazione prevalentemente miocardica nel coniglio [SERVI, 1933 ⁽⁴⁾], mentre iniettata per via intracerebrale, nei ventricoli, provoca alterazioni della eccitabilità dei chemiorecettori [RASKOVA e VANECEK, 1936 ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾]; nell'animale sensibilizzato, provoca profonde alterazioni circolatorie di carattere riflesso [VANECEK e RASKOVA, 1936 ⁽⁵⁾], ed inibisce anche, in piccole dosi, i riflessi condizionati [RASKOVA e VANECEK ⁽⁶⁾]; tutti questi fenomeni non hanno un carattere specifico, potendo anche essere provocati da altre tossine e

tre tossine ad essa non correlate, per quanto riguarda la costellazione antigene, quale l'endotossina di *S. typhosa* [RASKOVA e VANECEK, 1937 (7)].

Le ricerche citate dimostrano una ben definita tossicità cellulare della O-Streptolisina in vivo ed in vitro. Nella presente Nota vengono descritte le alterazioni citopatologiche, provocate dalla O-Streptolisina su colture cellulari; vengono, inoltre, riferiti i risultati di indagini condotte per precisare le caratteristiche della eventuale frazione responsabile ed i suoi rapporti con l'attività emolitica della O-Streptolisina.

MATERIALE E TECNICHE

O-Streptolisina. - Sono state usate O-Streptolisina Sclavo, I.S.M., e Cappel, che venivano disciolte al momento dell'uso secondo le indicazioni (si dà ottenere che 0,5 cm³ della soluzione fossero eguali ad 1 Unità emolitica).

Culture cellulari. - Sono state impiegate cellule di fegato umano (CHANG, 1934) e cellule del ceppo K.B. (EAGLE, 1933) (8).

Studio morfologico dell'azione citopatogena. - Lo studio completo di tale azione è stato effettuato su cellule di fegato mediante osservazione microscopica a piccolo ingrandimento direttamente sul tubo di coltura e mediante preparati istologici e colorazione con ematossilina-eosina. E' stata impiegata la stessa tecnica già seguita per lo studio della azione citopatogena della tossina di *Cl. histolyticum* [PENSO e VICARI, 1937 (9)].

Test di citotossicità in colture cellulari. - Vennero impiegate cellule del ceppo K.B.. Le cellule vennero coltivate in tubi con il seguente terreno di crescita:

Soluzione salina di Hanks	parti	88
Idrolizzato di lattealbumina (soluz. 5%)	"	10
Siero di vitello (inattivato per 30' a 56°C)	"	2

Le diluizioni di O-Streptolisina venivano, quindi, inoculate nella quantità di 0,5 cm³ di ogni diluizione in ciascuno di due o più tubi. I tubi venivano posti a 37°C per circa 20 ore, dopo di che veniva effettuata la lettura.

Inattivazione con calore. - L'inattivazione al calore della O-Streptolisina venne effettuata immergendo la soluzione, preparata all'istante, in

bagnomaria bollente, e per un periodo di tempo variante secondo i singoli esperimenti.

Inattivazione con colesterolo. - Una soluzione di colesterolo veniva preparata in metanolo alla concentrazione di 10^{-3} M rispetto al colesterolo; da tale soluzione vennero allestite diluizioni 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M in soluzione fisiologica. In altre ricerche (MERUCCI e VELLA, 1939) ⁽¹⁰⁾ era stato osservato che a queste diluizioni di colesterolo si passava da una inibizione completa della attività emolitica (10^{-5}) ad una inibizione nulla (10^{-8}) della Streptolisina con esse cimentata a 37°C per 45' in un rapporto di 1:1 (V:V).

Digestione mediante tripsina. - La tripsina venne usata alla concentrazione dello 0,23% disciolta in P.B.S. [DULBECCO e VOGT, 1934 ⁽¹¹⁾]. Le fiale di O-Streptolisina vennero disciolte con la soluzione di Tripsina nei volumi consigliati per la soluzione di esse; la digestione venne effettuata in termostato per tempi diversi, avendo cura di mantenere il pH tra 7,4 e 8,0 mediante l'aggiunta di NaOH N/10. Dopo la digestione la Tripsina veniva allontanata mediante riscaldamento a 100°C per 15', seguito da filtrazione.

Dialisi. - La O-Streptolisina disciolta con soluzione fisiologica tamponata con Veronal a pH 7,2 ed inattivata al calore in bagnomaria bollente per 60' veniva divisa in due aliquote; di queste, una veniva sottoposta a dialisi contro H₂O a 0°C per 20 ore in un sacchetto di cellophan Visking, mentre la frazione non dializzata veniva conservata in ghiacciaia e dopo 20 ore veniva portata allo stesso volume della frazione dializzata.

Immunizzazione di conigli con O-Streptolisina riscaldata. - Tre conigli adulti del peso di 3,5 kg. ciascuno vennero sottoposti a due cicli di immunizzazione con O-Streptolisina riscaldata; il primo ciclo fu costituito di otto iniezioni rispettivamente a ciascuno degli animali: cm³ 0,5; 1; 1; 1,5; 2; 3; 3; 3; il secondo ciclo venne praticato dopo quaranta giorni di riposo e consistette di sei iniezioni endovenose praticate ogni terzo giorno durante il quale vennero inoculati rispettivamente cm³ 1; 1; 1,5; 1,5; 2; 2; di O-Streptolisina riscaldata.

Il salasso dei conigli venne effettuato per puntura cardiaca 3 giorni dopo il termine della seconda serie di iniezioni. Un coniglio venne a morte durante questo secondo ciclo.

Il siero venne scomplementato mediante riscaldamento a 56°C per 30 min.

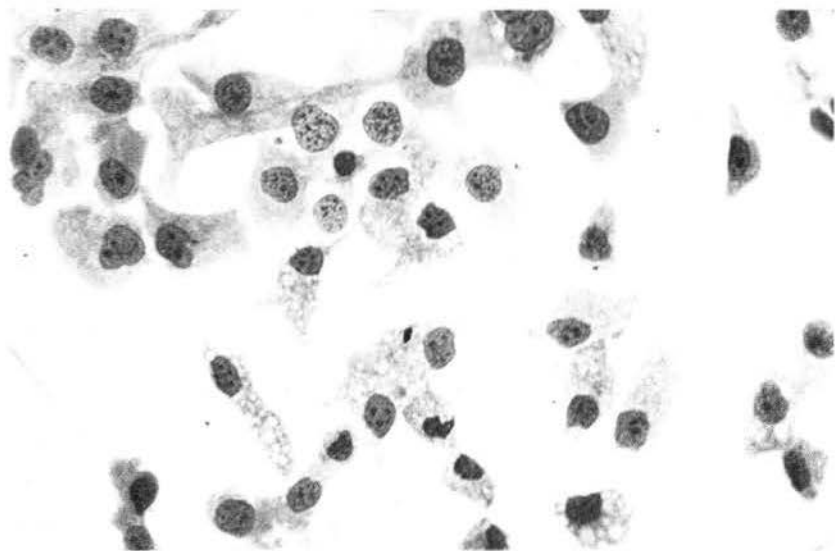


Fig. 1. - Degenerazione vacuolare e picnosi nucleare iniziale di cellule epatiche (ceppo Chang) trattate con O-Streptolisina (dopo 2 ore di contatto) (300 $\times$).

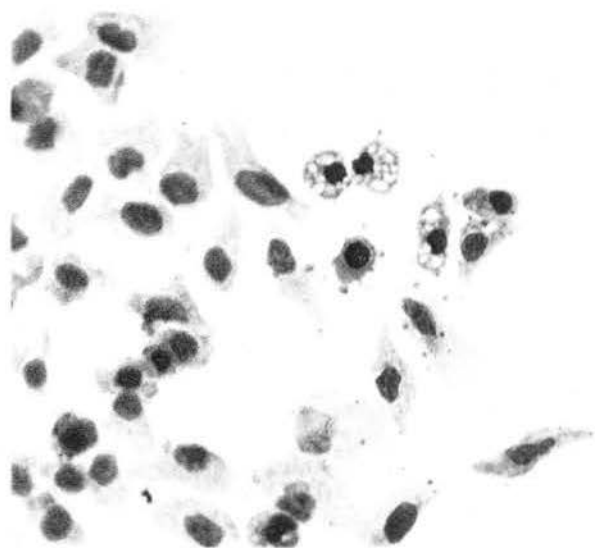


Fig. 2. - Accentuazione dei fenomeni sopradescritti (dopo 3 ore di contatto) (300 $\times$).

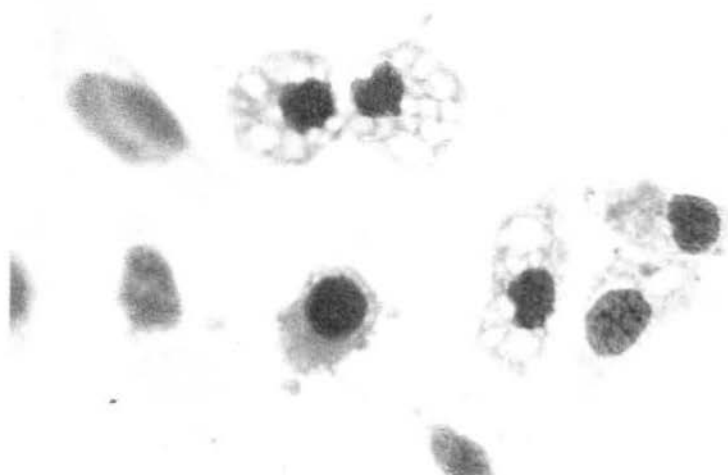


Fig. 3. - Particolare della Figura 2 (800 $\times$).

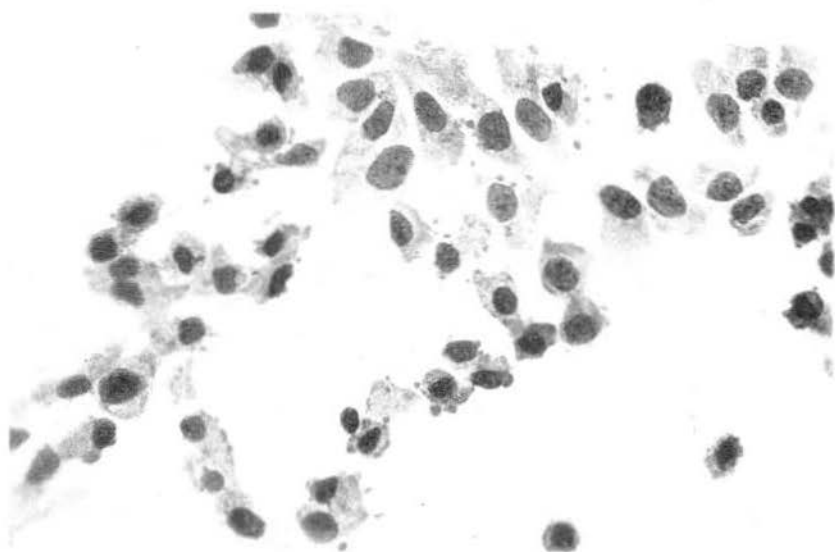


Fig. 4. - Picnosi nucleare e irregolarità dei limiti cellulari presentate da cellule epatiche (ceppo Chang) trattate con O-Streptolisina (dopo 4 ore di contatto) (300 $\times$).

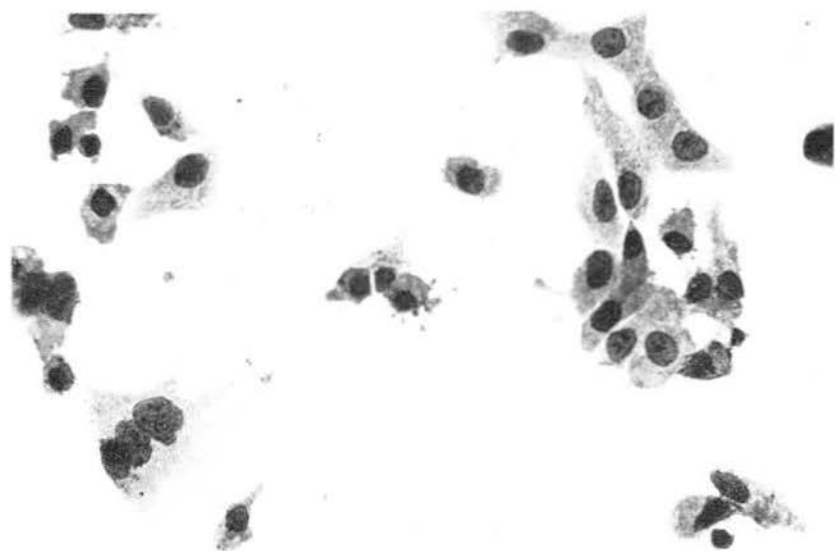


Fig. 5. - Cellule epatiche (ceppo Chang) trattate con O-Streptolisina (dopo 4 ore di contatto). I limiti cellulari sono irregolari a causa della presenza di protrusioni claviformi, che conferiscono alle cellule un aspetto ameboide (300 $\times$)

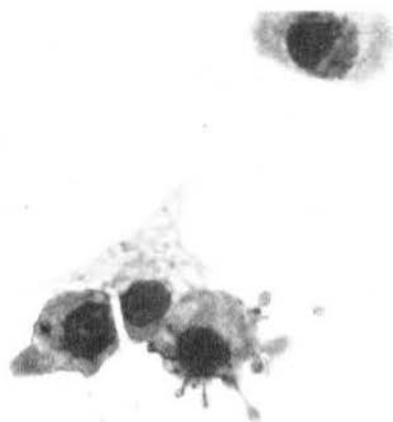


Fig. 6. - Particolare della Figura 5 (800 $\times$).

RISULTATI

AZIONE CITOPATOGENA SULLE CELLULE COLTIVATE IN VITRO.

Dei tre tipi di O-Streptolisina impiegati, solo la O-Streptolisina Sclavo esercita azione citopatogena sulle cellule coltivate in vitro. All'osservazione a fresco ed a piccolo ingrandimento si nota come tale azione si manifesta con una concentrazione di O-Streptolisina pari a 0,5 D.C. E./cm³ del terreno di coltura, dopo circa tre ore di contatto. Tale azione si accentua nelle ore successive e alla quarta, sesta ora, le cellule si presentano coartate; dopo 24 ore la quasi totalità delle cellule si sono distaccate dalla parete del tubo di coltura.

Istologicamente, dopo 2 ore si nota una degenerazione vacuolare, accompagnata da lievi segni di picnosi nucleare (fig. 1). Questi fenomeni sono più accentuati dopo 3 ore (fig. 2) e la degenerazione vacuolare raggiunge, talora un alto grado di intensità (fig. 3). Dopo 4 ore i limiti cellulari appaiono irregolari (fig. 4) a causa della presenza di protrusioni che talora sono a forma di clava, e conferiscono alla cellula un aspetto ameboide (figg. 5 e 6), e che dimostrano come la cellula stessa vada incontro a fenomeni di sofferenza simili a quelli osservati frequentemente nelle cellule infettate da virus.

AZIONE DEL RISCALDAMENTO SULL'EFFETTO CITOTOSSICO DELLA O-STREPTOLISINA.

Le streptolisine vennero sottoposte a riscaldamento a 100° in bagnomaria per 1 ora, 2 ore e 3 ore; successivamente ne venne saggiato l'effetto citotossico su colture di cellule in vitro (Cellule KB).

TABELLA 4.
Effetto citotossico di varie O-Streptolisine del commercio.

O-Streptolisina	Effetto citotossico dopo riscaldamento a 100° per		
	1 ora	2 ore	3 ore
Sclavo	++	++	++
I.S.M.	—	—	—
Cappel	—	—	—

- ++ = Effetto citotossico evidente con distacco pressoché totale delle cellule.
 + = Effetto citotossico evidente con distacco di gran parte delle cellule. Tutte le cellule presentano segni di degenerazione.
 ± = Effetto citotossico lieve. Alcune cellule sono indenni.
 — = Assenza di effetto citotossico.

Dalla tabella 1, risulta che solo una delle preparazioni di O-Streptolisina prese in esame presenta una rilevante azione citotossica. Gli esperimenti successivi intesi a definire la frazione responsabile della citotossicità, vennero di conseguenza condotti esclusivamente su quella preparazione che aveva dimostrato di possedere tale caratteristica.

Tale effetto risulta legato ad una frazione che si è dimostrata termolabile dopo esposizione a 100° in bagnomaria, prolungata fino a 3 ore.

STUDIO DELLA AZIONE CITOTOSSICA DELLA O-STREPTOLISINA INATTIVATA AL CALORE E SUCCESSIVAMENTE SOTTOPOSTA A DIALISI.

La O-Streptolisina disciolta nel volume consigliato con soluzione fisiologica, tamponata con Veronal a pH 7,2, veniva riscaldata per 60' in bagnomaria bollente e successivamente divisa in due aliquote, la prima delle quali veniva dializzata con H₂O a 0° per 20 ore: dopo dialisi il volume del sacchetto di dialisi risultava pari a volumi iniziali 1,5; anche l'aliquota non dializzata veniva diluita in maniera eguale con H₂O.

Le due aliquote venivano diluite con il tampone consueto alle diluizioni riportate nella tabella 2 e venivano cimentate su colture cellulari.

TABELLA 2.

Effetto della dialisi sull'azione citotossica della O-Streptolisina inattivata al calore.
(risultati letti alla 20^a ora)

	Effetto citotossico alle diluizioni di O-Streptolisina			
	1:1,5	1:3	1:6	1:12
O-Streptolisina inattivata al calore	++	++	±	±
O-Streptolisina al calore e successivamente dializzata	—	—	—	—

La frazione citotossica risulta pertanto dializzabile.

EFFETTO CITOTOSSICO DOPO TRIPSINIZZAZIONE.

L'azione della tripsina sulla O-Streptolisina inattivata al calore veniva prolungata fino a 2 ore avendo cura di mantenere il pH intorno ad

8 Aliquote di O-Streptolisina venivano prelevate ogni 20 minuti e cimentate (v:v; 1:1) con le colture di cellule, dopo che la tripsina era stata allontanata.

Anche dopo due ore di digestione triptica, l'effetto citotossico risultò evidente [(+ +)].

PROVE DI INIBIZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ DOPO CONTATTO DELLA O-STREPTOLISINA INATTIVATA PER 60' AL CALORE CON L'ANTISIERO ANTI O-STREPTOLISINA.

Il siero anti O-Streptolisina venne diluito in titolo di: 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:16, 1:20, 1:32, 1:40, 1:50, 1:64.

Le diluizioni vennero messe in contatto con la O-Streptolisina inattivata al calore per 60' (1:1; V:V); il contatto fu prolungato per 1 ora in termostato a 37°.

Successivamente le miscele vennero aggiunte a colture di cellule KB nei volumi consueti.

I risultati dell'effetto sulle colture in vitro di tessuti vennero letti alla 24^a ed alla 48^a ora.

TABELLA 3.

Effetto di un siero anti O-Streptolisina sulla citotossicità della O-Streptolisina inattivata al riscaldamento.

Lettura dopo	Diluizione del siero									
	1:2	1:4	1:8	1:10	1:16	1:20	1:32	1:40	1:50	1:64
24 ^a h	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48 ^a h	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Controlli:

O-Streptolisina inattivata (dil. 1:2 ed 1:4) + alla 24^a ora
con il riscaldamento: (dil. 1:2 ed 1:4) ++ alla 48^a ora

La citotossicità non viene inibita dal contatto della O-Streptolisina con il corrispondente antisiero di coniglio.

INIBIZIONE DELLA EMOLISI DA O-STREPTOLISINA AD OPERA DI SIERI ANTI O-STREPTOLISINA RISCALDATA.

Dei sieri anti O-Streptolisina (Antisiero I e II) riscaldata vennero allestite le seguenti diluizioni con soluzione fisiologica:

1:2, 1:4, 1:8, 1:12, 1:16, 1:24, 1:28, 1:38, 1:51, 1:67, 1:90, 1:120, 1:160, 1:210, 1:280.

Queste diluizioni dei sieri vennero cimentate (vol. : vol.; 0,5:0,5 cm³) con una soluzione di O-Streptolisina appena preparata con la quale vennero lasciate in contatto per 15 min. in termostato a 37°C.

Come controllo venne adoperata una serie di diluizioni di siero di coniglio normale, che venne in pari diluizioni messa a contatto con la O-Streptolisina in condizioni analoghe.

A tutte le provette delle 3 serie (due sieri di coniglio immunizzati ed un siero di coniglio normale di controllo), vennero aggiunti 0,5 cm³ di una sospensione di globuli rossi di coniglio al 5% in soluzione fisiologica. La lettura, effettuata dopo 45 min. di termostato a 37°C dette i seguenti risultati:

Antisiero I emolisi incompleta fino a : 210

Antisiero II emolisi incompleta fino a : 160

Siero controllo: emolisi completa a tutte le diluizioni.

Il siero ottenuto immunizzando i conigli con la O-Streptolisina inattivata al calore, esercita una protezione sia pure debole, delle emazie di coniglio nei confronti della emolisi da O-Streptolisina.

PRECIPITAZIONE DI UN SISTEMA O-STREPTOLISINA + SIERO ANTI O-STREPTOLISINA DI CONIGLIO CON UN SIERO DI POLLO ANTI SIERO DI CONIGLIO.

Siero anti O-Streptolisina: cm³ 0,10 in ciascuna provetta di una serie doppia di tre provette

O-Streptolisina riscaldata 60' a 100: cm³ 1,5; 2; 2,5 rispettivamente nella prima, seconda e terza provetta di ciascuna serie.

Sol. fis. tamp.: a volume di cm³ 2,60 in ciascuna provetta; poi per 45' in termostato a 37°.

Dopo 45' si aggiungono a ciascuna provetta cm^3 0,5 di una diluizione di siero di pollo antisiero di coniglio (1:10 con sol. fis. tamp.). La miscela viene posta nuovamente in termostato per 45'; si centrifuga per 5'.

Il supernatante viene aggiunto a colture di tessuti.

La lettura dopo 24 ore rivela un effetto citotossico evidentissimo (+++).

Controlli:

Siero di pollo + siero di coniglio cm^3 0.10+0,5 della dil. 1:10): effetto citotossico lieve ($\pm$).

Siero di coniglio + O-Streptolisina (cm^3 0.10+2,5): effetto citotossico evidente (++).

O-Streptolisina: effetto citotossico evidentissimo (+++).

Siero di pollo + O-Streptolisina (m^3 0,5 della dil. 1:10 + m^3 2,5): effetto citotossico evidentissimo (+++).

EFFETTO CITOTOSSICO DELLA O-STREPTOLISINA INATTIVATA CON IL COLESTEROLO.

Le preparazioni di O-Streptolisina, dopo contatto con colesterolo per 15 min. a 37°C (1:1; V:V) si dimostrarono tutte egualmente citotossiche, sia a diluizioni di colesterolo completamente inibenti l'attività emolitica (10^{-5}), sia a quelle alle quali tale inibizione risultava nulla.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dato che al momento non si hanno ancora preparazioni di O-Streptolisina ottenibili con criteri di purezza chimica, è consuetudine indicare con il nome di O-Streptolisina preparazioni che sono caratterizzate da una spiccata azione emolitica, proprietà che scompare, mediante l'ossigenazione, mediante il riscaldamento ed oltre certi limiti del pH. Ciò non significa che tali preparazioni, sia pure molto purificate, non contengano altre frazioni sia biologicamente attive, sia inerti.

Pertanto resta ammissibile che alcune preparazioni di O-Streptolisina manifestino azione diverse sia in vitro su cellule coltivate (PENSO e VICARI), sia a livello dei tessuti (LAWRENCE, RASKOVA), per la presenza in esse di dette frazioni; e che tale azione non sia sempre da imputare

alla emolisina dello streptococco, presunta come unità macromolecolare, ma, a seconda delle condizioni sperimentali, anche ad altre frazioni presenti in alcune ma non in tutte le preparazioni commerciali della streptolisina. La presenza di queste frazioni, dimostrabile con prove biologiche, potrebbe derivare o da caratteristiche peculiari del ceppo usato per la preparazione della streptolisina o da modalità intrinseche alla estrazione della streptolisina stessa.

Risulta altresì confermato dalle presenti ricerche, il fatto che la O-Streptolisina inattivata al calore, mantiene proprietà antigeni comuni colla lisina attiva, fatto questo già messo in evidenza mediante prove allergometriche nell'uomo [PAOLUZZI e SERVI, 1936 ⁽¹¹⁾].

Si può quindi affermare che la citotossicità della O-Streptolisina risulta legata ad una frazione che resiste al riscaldamento a 100°C in bagnomaria, che non viene inibita dal contatto della O-Streptolisina inattivata, sia con il corrispondente antisiero, sia con colesterolo; che tale streptolisina inattivata possiede ancora un'antigenicità comune con streptolisina attiva, cosicché il siero prodotto immunizzando dei conigli con la prima è capace di legarsi ancora alla seconda inibendo parzialmente l'attività emolitica; inoltre se si precipita con siero di pollo anti-siero di coniglio, il complesso O-Streptolisina-antisiero specifico di coniglio, si rileva la persistenza della azione citotossica, fatto questo che rende attendibile l'ipotesi che la frazione citotossica corrisponda una frazione priva di antigenicità, non proteica, dializzabile.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PENSO G., VICARI G. - Rend. Accad. naz. Lincei, Classe Sci. fis. mat. e nat., 22: (1937).
- (²) LAWRENCE J. C. - Brit. J. exp. Path., 40: 8 (1939).
- (³) SERVI M., PAULUZZI S., BARBIERI M. - Boll. I.S.M., 36: 477 (1937).
- (⁴) SERVI M. - Boll. I.S.M., 34: 392 (1935).
- (⁵) RASKOVA H., VANECEK K. J. - Science, 126: 700 (1937).
- (⁶) RASKOVA H., VANECEK K. J. - Arch. exp. Path. Pharmac., 229: 7 (1956).
- (⁷) RASKOVA H., VANECEK K. J. - J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 1: 56 (1957).
- (⁸) EAGLE H. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 89: 362 (1935).
- (⁹) PENSO G., VICARI G. - Rend. Ist. sup. Sanità, 22: 434 (1937).
- (¹⁰) MERUCCI P. e VELLA L. - Rend. Ist. sup. Sanità - 22: 830 (1939).
- (¹¹) DULBERGO R., VOGT M. - J. exp. Med., 99: 167 (1934).
- (¹²) PAULUZZI S., SERVI M. - Boll. Soc. it. Biol. sper., 32: 341 (1956).