

## Effetti del destrano e del polivinilpirrolidone sul comportamento delle idrolasi acide del fegato di ratto

ALDO GAUDIANO, GUIDO PETTI, MARIA POLIZZI, ELISABETTA BROCH (\*), MASSIMA BUCCI (\*), GIULIA GILARDI (\*\*), GABRIELLA SAMI (\*\*), ed ELISABETTA SANZINI (\*\*)

*Laboratori di Biologia*

**Riassunto.** — Sono state studiate le alterazioni dei lisosomi epatici in ratti inoculati con due sostanze macromolecolari usate come succedanei del plasma: il destrano e il polivinilpirrolidone (PVP). Tali alterazioni, rivelate mediante determinazione delle attività « insedimentabili » di alcune idrolasi acide, raggiungono un massimo dopo pochi giorni dall'iniezione (2 nel caso del destrano, 3-4 nel caso del PVP), ma scompaiono dopo una decina di giorni.

È stato anche studiato come variano le suddette alterazioni in funzione della dose iniettata.

**Summary** (*Effects of dextran and polyvinylpyrrolidone on the behaviour of acid hydrolases of rat liver*). — The AA. investigated the alterations of hepatic lysosomes in rats injected with two macromolecular substances employed as plasma expanders: dextran and polyvinylpyrrolidone (PVP). Such alterations, revealed by the determination of « non-sedimentable » activities of some acid hydrolases, reach a maximum a few days after the injection (2 days in the case of dextran, 3-4 days in the case of PVP), but they disappear after about 10 days.

The variation of these alterations in function of the injected dose was also investigated.

### INTRODUZIONE

Diversi AA. (BRASS, 1952; EGER & SCHULZ, 1965; JECKELN, 1952; SCHOEN, 1949) hanno segnalato effetti collaterali del destrano e del polivinilpirrolidone (PVP), sostanze macromolecolari usate come succedanei del

---

(\*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

(\*\*) Ospite dei Laboratori di Biologia.

plasma. In rapporto a queste segnalazioni sono le osservazioni istologiche di EGER & SCHULZ (1965), i quali hanno messo in evidenza fenomeni edematosi e talora necrotici a carico del parenchima nel fegato di ratti inoculati con tali composti. D'altro canto, le osservazioni istochimiche di Meijer & Willighagen (1961) avevano mostrato che questa ed altre sostanze macromolecolari vengono immagazzinate nelle cellule di Kupffer, e il destrano in particolare nel citoplasma delle cellule parenchimatiche.

Per esplorare con mezzi biochimici la funzionalità del tessuto epatico in ratti inoculati con destrano o con PVP, abbiamo studiato in precedenti lavori (GAUDIANO *et al.*, 1967; 1968) il comportamento e la distribuzione intracellulare di alcuni enzimi associati a vari tipi di strutture subcellulari: la citocromossidasi, enzima tipico dei mitocondri, la glucosio-6-fosfatasi del sistema reticolo-endoplasmatico e alcune idrolasi acide contenute nei lisosomi. Dopo 24 ore dall'iniezione del succedaneo del plasma, negli omogenati di fegato degli animali trattati non si era osservata alcuna alterazione delle attività citocromossidasi e glucosio-6-fosfatasi; l'attività delle idrolasi acide, invece, mostrava soprattutto un forte aumento della frazione che non sedimenta per ultracentrifugazione; l'iniezione di destrano o di PVP, cioè, fa aumentare notevolmente la porzione di tali enzimi non legata ai lisosomi. Ciò indica un'alterazione di queste particelle subcellulari, quale conseguenza dell'endocitosi provocata da varie sostanze macromolecolari (STRAUS, 1958) e può rispecchiare un aumento della fragilità o della permeabilità dei lisosomi.

Abbiamo ora seguito le variazioni quantitative di tale fenomeno in funzione di due parametri: il tempo e la dose.

Sottolineiamo che le nostre misure hanno mirato alle attività enzimatiche dei lisosomi epatici e pertanto allo stato funzionale di questi, mentre le misure cinetiche di JACQUES (1968) riguardarono l'attività perossidasi del fegato *in toto* in seguito all'iniezione di una perossidasi vegetale usata come *marker*.

#### PARTE SPERIMENTALE E RISULTATI

L'effetto del destrano in funzione del tempo è stato studiato su ratti albini di ceppo Wistar, del peso di circa 150 g, tenuti a dieta standard sia prima sia durante l'esperimento. Gli animali venivano inoculati per via endovenosa con 50 ml/kg di soluzione di destrano (\*); i controlli venivano iniettati con soluzione fisiologica. Dopo il tempo stabilito (6 ore, 24 ore,

---

(\*) *Macrodex* della ditta Baxter (soluzione al 6 % p/v di destrano con peso molecolare medio 75.000).

48 ore, 3-7-11 giorni), i ratti (6 per ogni gruppo) venivano pesati e uccisi per decapitazione; i fegati venivano subito rimossi e pesati in soluzione ghiacciata di saccarosio 0,25 M; venivano poi ridotti in poltiglia e omogenizzati con modalità standardizzate in un omogenizzatore di Potter (GAUDIANO *et al.*, 1967), in saccarosio 0,25 M a 4-5°C. Gli omogenati venivano portati a un volume corrispondente a 10 volte il peso del tessuto, con saccarosio 0,25 M; una porzione veniva usata per determinare l'azoto totale e le attività enzimatiche «totali», che venivano poi rapportate all'azoto epatico; un'altra porzione veniva sottoposta ad ultracentrifugazione a bassa temperatura (3.500.000 g/min) e nel sopranatante venivano determinate le attività «insedimentabili». I metodi di determinazione delle idrolasi acide ( $\beta$ -glicuronidasi, fosfatasi acida, catepsina,  $\beta$ -galattosidasi) sono descritti da DE DUVE *et al.* (1955) e da SELLINGER *et al.* (1960).

Come si vede dalla Tab. 1 e dalla Fig. 1, le attività «insedimentabili» di tutte le idrolasi acide subiscono un netto aumento, che raggiunge il suo massimo al secondo giorno; si ha poi un graduale ritorno ai valori iniziali, che vengono in genere raggiunti all'11° giorno. Percentualmente molto minore è l'aumento delle attività «totali», che raggiungono il massimo dopo 2-4 giorni, per poi tendere alla normalizzazione, sia pure con comportamento irregolare.

Risultati simili sono stati ottenuti con il PVP (\*\*), che è stato iniettato alla dose di 40 ml/kg di peso corporeo. In questo esperimento le determinazioni sono state estese ad altre idrolasi acide lisosomiali (DNA-asi e RNA-asi) e ad un enzima tipico dei perossisomi, la catalasi (CHANTRENNE, 1955).

Dalla Tab. 2, nella quale sono riportate, per brevità, solo le attività «insedimentabili», si vede che, mentre l'attività catalasica resta costante, le idrolasi mostrano un massimo, che questa volta appare fra i 3 e i 4 giorni; all'11° giorno tutte le attività tornano ai valori normali.

Lo studio della risposta a dosi diverse è stato effettuato somministrando da 5 a 60 ml della predetta soluzione di destrano per kg di peso corporeo; gli animali sono stati sacrificati 22 ore dopo l'iniezione e i fegati trattati come già detto. Come si vede dalla Fig. 2, anche la dose minima causa un netto aumento delle attività «insedimentabili». L'andamento delle curve dose-risposta mostra un *plateau* nell'intervallo fra 10 e 30 ml circa; in corrispondenza di tali valori la risposta è quasi la stessa, come confermato da ripetuti esperimenti con un totale di 20 animali per gruppo.

(\*\*) Periston della ditta Bayer (soluzione al 4% di PVP con peso molecolare medio 30.000).

TABELLA I

## Effetti del destrano a tempi diversi

P A R A M E T R I	Controlli (20)	6 h (6)	22 h (6)	36 h (6)	48 h (6)	4 gg (6)	7 gg (6)	11 gg (6)
N epatico: mg/g di or- gano fresco . . . . .	32,0 ± 1,1	31,4 ± 0,9	30,9 ± 1,1	31,9 ± 0,7	29,0 ± 0,9	30,0 ± 0,9	30,0 ± 1,0	28,8 ± 1,0
Attività « totali » (U.I./g di N) . . . . .								
β-glicuronidasi . . . . .	20,0 ± 1,1	20,7 ± 0,6	17,3 ± 0,8	15,6 ± 2,2	20,9 ± 1,9	(**) 30,0 ± 1,4	24,9 ± 4,4	28,5 ± 2,0
fosfatasi acida . . . . .	168 ± 14	190 ± 8	173 ± 9	180 ± 7	227 ± 15	(*) 230 ± 10	222 ± 11	192 ± 16
catepsina . . . . .	32,1 ± 1,6	29,9 ± 3,6	30,7 ± 2,2	35,7 ± 1,9	(*) 40,0 ± 3,1	—	34,2 ± 1,6	31,7 ± 2,6
β-galattosidasi . . . . .	166 ± 3	163 ± 8	158 ± 8	169 ± 24	(*) 230 ± 17	157 ± 14	189 ± 13	189 ± 33
Attività « insedimenta- bili » (% delle totali)								
β-glicuronidasi . . . . .	3,6 ± 0,2	7,5 ± 0,7	10,9 ± 1,3	13,3 ± 2,0	(**) 15,5 ± 1,6	10,9 ± 1,3	8,3 ± 0,9	3,5 ± 0,4
fosfatasi acida . . . . .	6,6 ± 0,6	9,3 ± 0,9	9,4 ± 0,3	10,1 ± 1,4	(**) 11,3 ± 0,7	7,7 ± 0,4	9,4 ± 1,0	6,8 ± 0,7
catepsina . . . . .	2,3 ± 0,5	5,8 ± 0,6	7,9 ± 0,7	9,3 ± 0,7	(**) 10,8 ± 1,2	—	7,1 ± 1,2	4,0 ± 0,5
β-galattosidasi . . . . .	6,1 ± 0,7	13,2 ± 0,5	18,4 ± 2,2	(**) 19,0 ± 3,8	18,2 ± 0,7	15,4 ± 1,0	15,3 ± 2,2	8,4 ± 0,8

(1) Numero degli animali.

(\*) P &lt; 0,05

(\*\*) P &lt; 0,01 { valori massimi rispetto ai controlli.

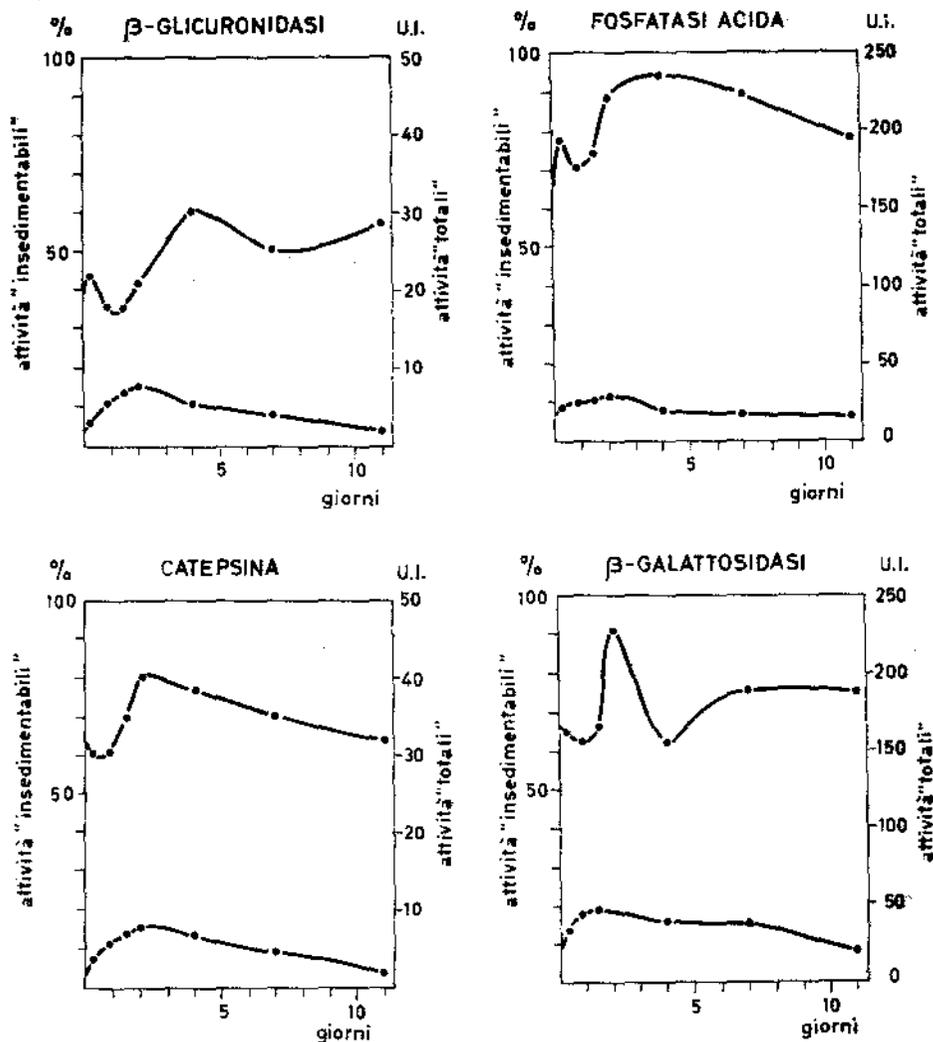


Fig. 1. — Attività « totali » (curve in alto) e « insedimentabili » (curve in basso) di alcune idrolasi acide di lisosomi epatici di ratte a tempi diversi dopo l'iniezione di destrano (v. particolari nel testo).

TABELLA 2

## Effetti del PVP a tempi diversi

P A R A M E T R I	Controlli (20)	14 h (6)	48 h (6)	3 ES (6)	4 ES (6)	5 ES (6)	11 ES (6)
N epatico: mg/g di organo fresco . . . . .	30,3±1,5	30,6±1,2	32,6±0,6	32,1±0,5	31,2±0,6	31,4±1,0	31,0±0,5
Attività « insedimentabili » (% delle « totali ») . . . . .							
β-glicuronidasi . . . . .	5,0±0,3	6,7±1,0	6,7±0,5	(*) 7,3±0,6	7,2±0,8	6,5±0,5	5,0±0,5
fosfatasi acida . . . . .	4,8±0,6	5,8±0,6	8,5±0,5	(**) 8,8±0,7	7,2±0,5	6,4±0,4	5,7±0,4
catepsina . . . . .	3,1±0,3	3,4±0,4	3,8±0,3	5,0±0,5	(*) 5,3±0,6	5,0±0,4	3,2±0,4
DNAasi . . . . .	2,6±0,2	3,2±0,5	4,5±0,4	(**) 6,0±0,5	5,1±0,5	3,4±0,8	2,9±0,3
RNAasi . . . . .	5,2±0,5	5,6±0,4	6,7±0,5	9,6±0,6	(**) 9,7±0,6	9,1±0,7	5,1±0,6
catalasi . . . . .	36±5	37±6	38±1	39±1	37±2	36±4	36±5

( ) Numero degli animali.

(\*)  $P < 0,05$

(\*\*)  $P < 0,01$  { valori massimi rispetto ai controlli.

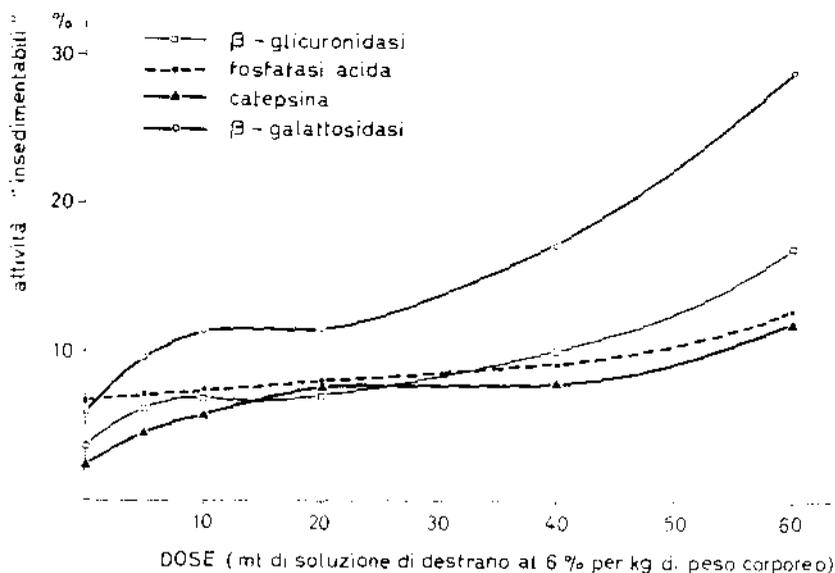


Fig. 2. — Variazioni delle attività «insedimentabili» di alcune idrolasi acide di lisosomi in ratti inoculati con dosi diverse di destrano (v. particolari nel testo).

### CONCLUSIONI

Gli attuali risultati, mentre confermano i nostri precedenti esperimenti in merito alle alterazioni lisosomiali causate dai sostituti del plasma, mostrano che tali alterazioni raggiungono il massimo dopo 2 o 3-4 giorni, rispettivamente per il destrano e il PVP, e sono reversibili entro una decina di giorni, almeno per quanto riguarda le manifestazioni biochimiche da noi studiate. C'è peraltro da osservare che, mentre gli effetti più rilevanti si sono manifestati in seguito all'inoculazione di dosi molto elevate, alterazioni già evidenti si sono rilevate anche con dosi più modeste, comparabili con quelle normalmente usate in terapia umana.

Lo spostamento di 1-2 giorni del massimo di attività del destrano rispetto al PVP sembra indicare una più lenta penetrazione di questa ultima sostanza nei lisosomi, ma può anche essere dovuto al fatto che il PVP non viene metabolizzato affatto, mentre il destrano può esserlo, sia pure in lieve misura (GRAY, 1953).

Indenni sono risultati i perossisomi, che notoriamente hanno una funzione molto diversa da quella dei lisosomi e in particolare non hanno nessun ruolo nel processo dell'endocitosi.

Quanto all'aumento delle attività totali delle idrolasi, esso è stato osservato, per la fosfatasi e la  $\beta$ -glicuronidasi, da MEIJER & WILLIGHAGEN (1961)

in seguito a iniezioni ripetute di destrano o di PVP e da essi ritenuto un fenomeno aspecifico, collegato con l'accumulo di sostanze estranee nel fegato: può essere dovuto o ad un aumento del numero dei lisosomi o ad una maggior produzione di enzimi nei lisosomi stessi.

Infine, il *plateau* mostrato nella Fig. 2 si può spiegare ammettendo l'esistenza di almeno due diverse popolazioni lisosomiali, caratterizzate da diversa resistenza meccanica: una ha una minore resistenza e viene alterata da 10-20 ml di soluzione di destrano per kg di peso corporeo; l'altra ha una maggiore resistenza, distribuita in un intervallo piuttosto ampio, e viene sempre più alterata man mano che si aumenta la dose di destrano. Del resto, l'eterogeneità dei lisosomi è stata provata da vari AA. (JACQUES, 1968) in base all'osservazione di diverse proprietà, quali l'aspetto morfologico e il coefficiente di sedimentazione.

Ricevuto l'11 luglio 1974.

Accettato il 26 luglio 1974.

#### BIBLIOGRAFIA

- BRASS, K., 1952. *Frankfurt. Z. Pathol.*, **63**, 95.
- CHANTRENNE, H., 1955. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 410.
- DE DUVE, C., B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX & F. APPELMANS, 1955. *Biochem. J.*, **60**, 604.
- ÉGER, W. & E. SCHULZ, 1965. *Der Anaesthesist*, **14**, 332.
- GAUDIANO, A., S. TARTARINI, M. T. GHIO & G. PETTI, 1967. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **43**, 678.
- GAUDIANO, A., G. PETTI, M. POLIZZI, S. TARTARINI & G. M. BARTOLI, 1968. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **44**, 844.
- GRAY, I., 1953. *Amer. J. Physiol.*, **174**, 462.
- JACQUES, P., 1968. *Epuration plasmatique de protéines étrangères, leur capture et leur destinée dans l'appareil vacuolaire du foie*, Librairie Universitaire, Louvain.
- JECKELN, E., 1952. *Virchows Arch. path. Anat.*, **322**, 529.
- MELJER, A. E. F. H. & R. G. J. WILLIGHAGEN, 1961. *Biochem. Pharmacol.*, **8**, 389.
- SCHOEN, H., 1949. *Klin. Wochenschr.*, **27/28**, 463.
- SELLINGER, O. Z., H. BEAUFAY, P. JACQUES, A. DOYEN & C. DE DUVE, 1960. *Biochem. J.*, **74**, 450.
- STRAUS, W., 1958. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 541.
- WATTIAUX, R. & C. DE DUVE, 1956. *Biochem. J.*, **63**, 606.

## Episodio tossinfettivo da *Salmonella enteritidis* nell'area di Paternò (Catania)

ANNA MARIA PATTI e ANGELO NOTARRIGO

*Istituto di Igiene, Università di Catania*

**Riassunto.** — Sono stati esaminati 15 campioni fecali di soggetti colpiti da tossinfezione alimentare. In 6 campioni è stata ritrovata *S. enteritidis*.

**Summary** (*An outbreak of Salmonella enteritidis toxi-infection in the area of Paternò, Catania*). — An outbreak of *Salmonella toxi-infection* as a result of eating contaminated meat is described.

A total of 15 cases was reported. The majority of cases showed a pattern of familiar distribution, with many members affected in some families which had consumed meat bought from two butchers. The investigations made on the subjects affected led to the isolation of *Salmonella enteritidis*.

The meaning of the results we have found is discussed.

---

Un nuovo episodio di tossinfezione alimentare da *Salmonella* si è aggiunto a una lunga serie di manifestazioni simili descritte in vari paesi. Il ripetersi di tali episodi tiene sempre vivo l'interesse epidemiologico delle salmonellosi e invita a non trascurare quei casi che, pur di modesta entità, permettono tuttavia di compiere accurati accertamenti.

L'episodio del quale ci siamo occupati è avvenuto a Paternò (Catania) nel novembre 1972. 20 soggetti presentarono sintomi di tossinfezione alimentare di varia gravità. I casi si manifestarono fra persone che il 26 novembre 1972 avevano mangiato carne venduta in due macellerie. La tossinfezione colpì in prevalenza i componenti delle famiglie che avevano acquistato e consumato carne bovina tritata utilizzata sia per polpette che mista con carne di suino nelle salsicce. Furono risparmiati coloro che nella stessa giornata e nelle stesse macellerie avevano acquistato carne bovina non tritata.

I primi sintomi della maggior parte dei soggetti colpiti si manifestarono entro un tempo variabile dalle 3 alle 12 ore dal pranzo. La fenomenologia

morbosa fu contrassegnata da manifestazioni gastroenteritiche, febbre, dolori addominali e variò per intensità e durata nei diversi soggetti; in linea di massima ebbe breve durata e fu di lieve gravità; infatti la scomparsa dei sintomi si ebbe in pochissimi giorni.

#### *Accertamenti di laboratorio*

Furono eseguite coproculture a partire da tamponi rettali prelevati dai soggetti colpiti il giorno 27 novembre 1972. Campioni di sangue furono prelevati due giorni più tardi per accertamenti sierologici.

Le indagini furono eseguite secondo i procedimenti correntemente usati per la ricerca di microorganismi agenti di tossinfezioni alimentari (Salmonelle ed altri enterobatteri) Stafilococchi, Streptococchi, ecc.). In particolare la ricerca di Salmonelle fu effettuata impiegando il brodo selenito come arricchimento e l'agar SS come terreno di isolamento, praticando su questo ultimo terreno semina diretta e dopo arricchimento.

#### *Risultati*

Per quanto riguarda gli accertamenti coproculturali la semina diretta su agar SS portò all'isolamento in tre su 15 campioni fecali di colonie non fermentanti il lattosio. Dalla semina in SS dopo arricchimento si riscontrarono, in 6 campioni su 15, colonie lattosio negative ascrivibili come le prime al genere Salmonella in base alle caratteristiche morfologiche, biochimico-metaboliche e sierologiche. Il saggio sierologico, confermando l'attività biochimica dei ceppi in esame denotò che gli stipti appartenevano al gruppo D<sub>1</sub> dello schema di Kauffman (antigeni somatici 1-9-12). Gli antigeni flaggellari (9, m, -) dimostrarono che si trattava di *S. enteritidis* stipte endemico in Sicilia. Il riconoscimento è stato confermato presso il Centro Enterobatteri Patogeni per l'Italia Meridionale (Istituto d'Igiene, Palermo).

Riconosciuto il microorganismo responsabile della tossinfezione si poté procedere alla valutazione della risposta sierologica in quattro dei soggetti colpiti cimentando i sieri in esame in prove di agglutinazione con lo stipte incriminato e con uno stipte di collezione di *S. enteritidis*, entrambi adoperati sotto forma di sospensione microbica trattata con alcool o con formolo al fine di poter determinare anticorpi O, H. In tutti e quattro i casi si ebbe risposta negativa.

#### *Caratteristiche degli stipti isolati*

Lo studio approfondito degli stipti di Salmonella isolati fornì i seguenti risultati; tutti gli stipti risultarono di forma bastoncellare, mobili asporigeni, Gram negativi; glucosio e mannite furono fermentati rapidamente

con produzione di gas, l'arabinosio fu fermentato in poche ore (caratteristica questa che serve a distinguere *S. duclini* da *S. enteritidis* che ha le stesse caratteristiche biochimiche; la prima infatti attacca l'arabinosio con ritardo). Dulcitate, inosite, adonite, xilosio furono fermentati in circa 10 giorni. Il lattosio non fu fermentato e negativa risultò pure la ricerca della  $\beta$ -galattosidasi.

Gli stipiti mostrarono struttura antigene propria della *S. enteritidis* (1-9-12; 9, m, -).

Sugli stipiti isolati furono anche eseguiti antibiogrammi; tutti gli stipiti risultarono sensibili a carbenicillina, cloranfenicolo, tetraciclina, cefaloridina, ampicillina, acido nalidixico, colimicina, gentamicina.

### Considerazioni

La descrizione di questo episodio mette in evidenza ancora una volta l'andamento delle tossinfezioni alimentari in Sicilia, cioè il loro verificarsi in forma di scoppi epidemici più o meno gravi.

Interessata è l'area del comune di Paternò del quale già ci siamo occupati nel corso di indagini precedenti (PATTI & NOTARRIGO, 1971). PUGLISI & MAIDA nel 1967 riferirono i risultati di una indagine su un episodio di tossinfezione che assunse cospicue proporzioni in quanto furono interessati i componenti di 48 nuclei familiari.

Quella volta l'agente responsabile era *S. paratyphi B*, varietà java che fu isolata da 9 dei 15 campioni fecali. La medesima Salmonella fu isolata anche dalla carne che, come sempre avviene in questi casi, era stata smerciata sotto forma di carne tritata.

In un'altra inchiesta (PATTI & NOTARRIGO, 1971) sui portatori di Salmonella tra gli animali regolarmente macellati a Paternò ben 18 stipiti di Salmonella furono isolati su 174 animali esaminati. Le Salmonelle erano *S. newington* e *S. schleissheim*. Quindi, se da un lato gli episodi di tossinfezione hanno come origine la macellazione clandestina e verosimilmente di animali abbattuti con urgenza e in stato di malattia, d'altra parte il riscontro di Salmonelle in animali abbattuti regolarmente in un pubblico macello mette in evidenza la carenza di effettivi controlli veterinari sugli animali.

Nell'episodio del quale ci siamo occupati la carne era stata venduta quasi tutta sotto forma di carne tritata, e questa ha indubbiamente favorito la moltiplicazione delle Salmonelle, esponendo i consumatori (in larga parte bambini) all'introduzione di cariche elevate del microorganismo in esame.

L'alto rischio del consumo di carne tritata di animali infetti è ben documentato dall'occorrere di numerosi episodi tossinfettivi descritti in vari paesi (KAUFFMANN, 1941; CEFALÙ, 1950; PUGLISI & MAIDA, 1969).

Per quel che riguarda la negatività della risposta sierologica c'è da osservare che nelle salmonellosi le agglutinine per l'agente infettante non compaiono costantemente, e comunque la loro comparsa è sempre tardiva (una settimana e anche più dallo scoppio della sintomatologia morbosa).

Ricevuto il 22 luglio 1974.

Accettato il 25 settembre 1974.

#### BIBLIOGRAFIA

- CEPALÙ, M., 1950. *Giorn. Mal. Infett. Parassit.*, 2, 102.
- KAUFFMAN, F., 1941. *Die Bakteriologie der Salmonella Gruppe Munksgaard*, Ed. Copenhagen.
- PATTI, A. M. & A. NOTARRIGO, 1971. Ricerca di Salmonelle in bovini e suini in un pubblico macello nell'area di Catania. In corso di pubblicazione.
- PUGLISI, C. & A. MAIDA, 1969. Su di un episodio di tossinfezione alimentare da *S. java*; *Ig. Mod.*, anno LXII, n. 1,2.