

65. COMPARSA CICLICA DI TRIPANOLISINE E TRIPANOAG-
GLUTININE NEL SANGUE DI CAVIE TRIPANOSOMIATE.

Notissimi sono i due fenomeni immunitari provocabili col siero di cavie tripanosomiate: l'agglutinazione e la lisi.

Ambedue scoperti da Laveran e Mesnil — l'agglutinazione nel 1900 ⁽¹⁾ la lisi nel 1902 ⁽²⁾ —, i due fenomeni hanno avuto un seguito importante di lavori e di ricerche e hanno dato luogo a vivaci, lunghe e non ancora conciliate discussioni.

Per l'agglutinazione noi sappiamo che il fenomeno si avvera sempre con i sieri specifici e può aversi anche ad altissimo titolo e che, secondo molti Autori — per la bibliografia dei quali rimando alla monografia del Penso su i fenomeni immunitari nelle tripanosomiasi ⁽³⁾ —, questa reazione non sarebbe specifica ma semplicemente di gruppo, a parte il fatto, poi, che il siero di alcuni animali sani sarebbe spontaneamente agglutinante verso i tripanosomi.

Per la lisi si sa che gl'immunsieri sono capaci di esercitare sui tripanosomi un'azione litica in vitro. Tutti gli Autori che hanno studiato il fenomeno hanno senz'altro ammesso che la stessa cosa debba avvenire in vivo e che a questa azione litica del siero si debbano attribuire le scomparse periodiche dei tripanosomi dal torrente circolatorio. Fatto, però, non accettato da tutti, poichè alcuni Autori hanno potuto dimostrare che durante la crisi i tripanosomi si rifugiano negli organi interni, dove compiono uno speciale ciclo di vita, per poi ritornare biologicamente e biogeneticamente rinnovati nel torrente circolatorio.

Senza entrare nell'intimo di questa discussione, che non interessa ai fini del presente lavoro, mi limiterò a ricordare come lo studio dei fenomeni litici nelle tripanosomiasi sia appunto derivato dalla constatazione della comparsa ciclica dei tripanosomi nel sangue circolante degli animali infestati.

Con le presenti ricerche io ho voluto vedere se oltre ai tripanosomi, anche gli anticorpi compaiono in circolo ciclicamente e fra gli anticorpi

mi sono per adesso soffermato sulle tripanolisine e sulle tripanoagglutinine.

Ho inoculato, allo scopo, una serie di cavie con un ceppo di *Trypanosoma Brucei*, da anni conservato nel nostro Istituto, ed ho cominciato a saggiare giornalmente le proprietà litiche ed agglutinanti del siero delle cavie inoculate.

Nel primo e secondo giorno dalla inoculazione sottocute — quando, cioè, i tripanosomi non sono ancora in circolo — il siero degli animali infestati non presenta praticamente nè tripanoagglutinine nè tripanolisine, comportandosi esso come il controllo costituito da siero di cavia normale.

A partire del terzo giorno, però, mentre non vi è ancora nessuna traccia di tripanoagglutinine, cominciano a manifestarsi le tripanolisine che vanno rapidamente aumentando per raggiungere e permanere al loro massimo allorchè i tripanosomi pullulano nel sangue circolante.

Nel 70% circa degli animali inoculati sopravviene, com'è noto, a questo punto la così detta « crisi », che si manifesta con la improvvisa scomparsa dei tripanosomi dal torrente circolatorio. Il sangue resta, però, infestante malgrado in esso non si riescano a mettere in evidenza, nè a fresco nè in preparati colorati, tripanosomi di sorta.

Molti Autori — dopo le primitive ricerche di Rodert e Vallet (4) — attribuiscono queste crisi alle tripanolisine che, accumulatesi enormemente in circolo, avrebbero, a un dato momento, provocata la improvvisa e completa distruzione dei tripanosomi circolanti.

Altri Autori, invece, supposero prima e dimostrarono poi — la dimostrazione sperimentale fu data dal Penso (5) — che tali crisi non sono dovute a distruzione dei parassiti per fatti immunitari ma a trasmigrazione dei tripanosomi stessi negli organi interni dove compiono determinate fasi del loro ciclo di sviluppo.

Per adesso io non voglio entrare nel merito di questa discussione, e mi limito a riferire come, subito dopo la crisi, il quadro immunologico del siero delle cavie tripanosomiate cambi improvvisamente per la comparsa di un nuovo anticorpo: le tripanoagglutinine.

Se, infatti, a questo momento si mette a contatto il siero degli animali in crisi con sangue tripanosomiato o con tripanosomi isolati dal sangue con uno dei tanti metodi che la tecnica consiglia, si vedono i

tripanosomi raggrupparsi improvvisamente in ammassi a volte imponenti.

Se si segue la sorte di questi gruppi, si vedrà come, dopo l'agglutinazione, si avveri la lisi, pur rimanendo i tripanosomi agglutinati.

Terminato il periodo in cui i tripanosomi sono assenti dal circolo — periodo che dura in media 48-72 ore — le proprietà agglutinanti del siero scompaiono di nuovo permanendo, invece, le proprietà litiche del siero stesso.

Questo fenomeno io l'ho constatato in diecine e diecine di animali e costituisce un fatto costante e non una semplice casualità.

Vediamo, ora, il fenomeno un po' più da vicino, sintetizzando i vari protocolli di esperienze.

Premetto che in questa prima serie di ricerche io non mi sono preoccupato del titolo a cui i vari fenomeni si verificano, ma mi sono limitato a ricercare l'avverarsi o meno dei fenomeni in questione. Per questo motivo ho sempre lavorato con sieri diluiti a metà, in quanto che adoperavo 1 cm³ di siero e 1 cm³ di sospensione di tripanosomi in soluzione fisiologica, separati con la tecnica di Mannozi-Torini (6).

Come controlli ho adoperato siero normale di cavia e soluzione fisiologica.

Eseguita la reazione, mettevo i tubi in termostato a 37° e osservavo dopo 30 minuti, dopo 2 ore, dopo 5 ore, dopo 8 ore. Non ho tenuto conto delle osservazioni fatte dopo la ottava ora, perchè, col passare del tempo, si aveva lisi intensa anche nei controlli, tanto che, dopo 24 ore, era impossibile distinguere anche un solo tripanosoma nelle varie sospensioni praticate.

Ecco qual'è stato il risultato medio delle osservazioni a fresco:

DOPO 30 MINUTI.

Soluzione fisiologica: (1 cm³ di sospensione di tripanosomi + 1 cm³ di sol. fis.).

Tripanosomi con movimenti vivacissimi, nessun accenno ad agglutinazione.

Siero di cavia normale: (1 cm³ di siero + 1 cm³ di sospensione di tripanosomi in sol. fis.).

Tripanosomi con movimenti vivacissimi, nessun accenno ad agglutinazione.

Siero di cavia normale: (1 cm³ di siero + 1 cm³ di sospensione di tripanosomi in sol. fis.).

Tripanosomi agglutinati in grossi gruppi, i singoli protozoi conservano la loro mobilità.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e prima della crisi: (1 cm³ di siero + 1 cm³ di sospensione di tripanosomi in sol. fis.).

Tripanosomi con movimenti vivacissimi, nessun accenno ad agglutinazione.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e dopo la crisi: (1 cm³ di siero + 1 cm³ di sospensione di tripanosomi in sol. fis.).

Tripanosomi con movimenti vivacissimi, nessun accenno ad agglutinazione.

DOPO 2 ORE.

Soluzione fisiologica: Tripanosomi con movimenti vivaci, nessun accenno ad agglutinazione.

Siero di cavia normale: tripanosomi con movimenti vivaci, nessun accenno ad agglutinazione.

Siero di cavia in crisi: tripanosomi agglutinati in grossi ammassi, in alcuni dei quali i singoli tripanosomi conservano la loro mobilità, in altri sono in via di lisi.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e prima della crisi: tripanosomi con movimenti vivaci; alcuni altri in via di lisi, nessun accenno ad agglutinazione.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e dopo la crisi: tripanosomi con movimenti vivaci, molti in via di lisi; anche qui nessun accenno a fenomeni di agglutinazione.

DOPO 5 ORE.

Soluzione fisiologica: non si vedono forme mobili; alcune delle immobili sono in via di lisi.

Siero di cavia normale: numerosi tripanosomi ancora mobili, alcuni immobili altri in via di lisi.

Siero di cavia in crisi: alcuni tripanosomi sono ancora mobili e agglutinati in piccoli gruppi; gran parte dei grossi ammassi sono lisati.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e prima della crisi: non si vedono forme mobili, tutti i tripanosomi sono lisati o in via di lisi.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e dopo la crisi: non si vedono forme mobili, tutti i tripanosomi sono lisati o in via di lisi.

DOPO 8 ORE.

Soluzione fisiologica: tutti i tripanosomi sono lisati salvo qualche forma in via di lisi.

Siero di cavia normale: numerosi tripanosomi ancora mobili, moltissimi lisati o in via di lisi.

Siero di cavia in crisi: qualche piccolo gruppo con tripanosomi ancora mobili.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e prima della crisi: quasi tutti i tripanosomi sono lisati, rare forme in via di lisi.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e dopo la crisi: rare forme in via di lisi, tutto il resto è lisato.

DOPO 20 ORE.

Soluzione fisiologica: lisi totale.

Siero di cavia normale: lisi totale.

Siero di cavia in crisi: residui di ammassi, in via di lisi.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e prima della crisi: lisi totale.

Siero di cavia con tripanosomi in circolo e dopo la crisi: lisi totale.

Dall'insieme dei risultati ottenuti si può, quindi, concludere che il siero di cavia con tripanosomi in circolo ha netto potere litico e che il siero di cavia in crisi ha netto potere agglutinante senza avere, per questo, perduto le sue proprietà litiche — che sono tuttavia leggermente diminuite.

Interessante è l'osservazione della comparsa ciclica di questi due anticorpi nel sangue e come vi sia una specie di antitesi tra agglutinine e presenza di tripanosomi in circolo. Questa antitesi si può ancora meglio mettere in evidenza trattando con preparati arsenicali gli animali infe-

stati: i tripanosomi scompaiono, allora, dal circolo — ma si riesce a rinvenirli modificati nel midollo delle ossa — e nel siero compaiono subito dopo le agglutinine che permangono sino alla ricomparsa dei tripanosomi nel sangue circolante. Se l'animale si trova allora in abbastanza buone condizioni da sopportare un nuovo ciclo effettivo, vale a dire se è capace di superare la nuova invasione di tripanosomi sino al sopraggiungere della crisi, allora sarà possibile rinvenire nuovamente nel siero le tripanoagglutinine.

Come spiegare, ora, questa comparsa ciclica di un anticorpo in circolo? Le ipotesi sono due.

O agglutinine si formano esclusivamente in seguito alla presenza in circolo di tripanosomi morti e lisati che soli sarebbero capaci di dare origine a questo tipo di anticorpo.

O agglutinine si formano soltanto quando i tripanosomi sono in fase ciclica e in forma di *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, così come si rinvencono nel midollo delle ossa o negli organi interni al momento della crisi o in seguito alla iniezione di preparati arsenicali.

La prima ipotesi collimerebbe con le vedute di quegli Autori che considerano la crisi conseguenza di una grande distruzione di tripanosomi dovuta all'accumulo in circolo di una notevole quantità di lisine; converrebbe altresì all'osservazione della comparsa delle tripanoagglutinine dopo l'iniezione di un preparato arsenicale che — se ha una indiscutibile azione sull'evoluzione ciclica dei tripanosomi che ritornano innanzi tempo in forme giovanili riscontrabili negli organi interni — deve senza dubbio provocare la morte e la distruzione di numerose forme adulte; concorderebbe, infine, anche con gli esperimenti del Lange (⁷), il quale osservò che si potevano preparare sieri dotati di potere tripanoagglutinante inoculando a conigli sani corpi morti di tripanosomi.

La seconda ipotesi si addirebbe, invece, alle vedute di quell'altro gruppo di Autori che considerano le crisi non come « crisi tripanolitiche », ma come una « fase trasmigratoria » o come una « crisi ciclica » per la quale improvvisamente tutti i tripanosomi scompaiono dal circolo per andare a invadere — trasformandosi nelle loro varie forme cicliche — il midollo delle ossa, le ghiandole linfatiche, il fegato, il polmone, il tessuto e i capillari del sistema nervoso centrale. Concorderebbe anche con

l'osservazione della comparsa di agglutinine dopo l'iniezione di preparati arsenicali, in quanto che questi determinano la trasformazione negli organi interni, dei tripanosomi in forme cicliche.

A favore di questa seconda ipotesi sta anche il fatto che (malgrado la comparsa del potere agglutinante) il potere litico del siero permane durante le crisi; non solo, ma esso è intensissimo al momento della ricomparsa dei tripanosomi in circolo i quali vanno sempre più aumentando di numero sino alla morte dell'animale, momento in cui essi raggiungono spesso cifre iperboliche.

Se fossero ora le lisine a determinare la improvvisa scomparsa dei tripanosomi dal torrente circolatorio, perchè i tripanosomi tornano se le lisine permangono? e non solo tornano, ma aumentano continuamente di numero malgrado aumenti di pari passo il potere litico del siero.

Dalle presenti ricerche non è tuttavia agevole rispondere soddisfacentemente a tutti i quesiti che si possono affacciare per dimostrare vera una delle due ipotesi enunciate. Resta in ogni modo dimostrato il fatto che nel sangue circolante di cavie tripanosomiate si ha una comparsa ciclica di tripanolisine e tripanoagglutinine, le quali ultime si rinvencono soltanto nei periodi in cui i tripanosomi sono, per un motivo qualsiasi, assenti dal torrente circolatorio.

RIASSUNTO

Si dimostra come nel sangue di cavie tripanosomiate si abbia una comparsa ciclica di tripanolisine e tripanoagglutinine e come queste ultime si manifestino soltanto nei periodi in cui i tripanosomi sono assenti dal torrente circolatorio.

SUMMARIUM

Ostendit Auctor in caviarum trypanosomiatarum sanguine trypanolysinās et trypanoagglutininas cyclice apparere; trypanoagglutininas autem tunc modo cum trypanosomata absint a sanguineo, quem dicimus, circulo.

BIBLIOGRAFIA

(¹) LAVERAN A. e MESNIL F., « Sur l'agglutination des trypanosomes du rat par divers sérums », C. R. Soc. Biol., 52, 939 (1900).

(²) LAVERAN A. e MESNIL F., « Recherches morphologiques et expérimentales sur le trypanosome du nagana ou maladie de la mouche tse-tse », Ann. Inst. Pasteur, 16, 1 (1902).

(³) PENSO G., « I fenomeni immunitari nelle tripanosomiasi » Studio monografico, Ren. dell'Ist. di San. Pub., 1, 931 (1938).

(⁴) RODET A. e VALLET G., « Contribution à l'étude des tripanosomes. Recherches expérimentales sur le *Trypanosoma Brucei* », Arch. Méd. Exp., 17, 450 (1906).

(⁵) PENSO G., « Sul ciclo di sviluppo del *Trypanosoma gambiense* sugli ospiti vertebrati », Ann. di Med. Nav. e Col., 60, 25 (1934).

(⁶) MANNOZZI-TORINI M., « Una tecnica per la separazione dei tripanosomi dal sangue circolante e preparazione di emulsioni di tripanosomi », Boll. Ist. Sier. Mil., 17, 824 (1938).

(⁷) LANGE, « Makroskopische Agglutination bei Trypanosomen » Vereinig. f. Mikrobiol. Dresden, Juni 1911 in Ctrbl. f. Bakt. Ref. Beilage, 50, 171 (1911).

