

24. S. BETTINI - L. RAVAIOLI - G. CANTORE (*). — Nota preliminare sulla preparazione di un siero immune specifico verso il veleno di *Latrodectus 13-guttatus* ROSSI.

Riassunto. — Gli Autori espongono le loro esperienze sull'azione terapeutica di sieri immuni da coniglio sul latrodectismo indotto in animali di laboratorio. Vengono descritti la tecnica per il prelevamento delle ghiandole velenifere di *L. 13-guttatus* che hanno costituito il materiale antigene, ed il metodo per la produzione di siero immune da coniglio. Il siero immune è riuscito a proteggere il topino e la cavia da dosi mortali di veleno.

Résumé. — Les auteurs décrivent leurs expériences sur l'action thérapeutique de sérums immunisants de lapins sur le latrodectisme provoqué chez des animaux de laboratoire. Ils décrivent la technique employée pour prélever le venin des glandes de *L. 13-guttatus* qui a servi de matériel antigène, et la méthode pour la production du sérum immunisant de lapin. Ce sérum immunisant a protégé souris et cobayes contre des doses mortelles de venin.

Summary. — The Authors report their experiments on the therapeutic action of rabbit immune serum on latrodectismus induced on laboratory animals. The technique used in collecting the venomous glands (antigen) of *L. 13-guttatus* and the method of production of a rabbit immune serum are described. The immune serum showed to protect the mouse and the guinea-pig from lethal doses of poison.

Zusammenfassung. — Die Verfasser berichten ihre Erfahrungen über die therapeutische Wirkung von Immunisierungs-Seren, die von Kaninchen stammen, bei Folgeerscheinungen des Giftes des *Latrodectus*, die bei Versuchstieren künstlich hervorgerufen waren. Beschrieben wird das Verfahren zur Entnahme der Giftdrüsen des *Latrodectus tredecimguttatus*, die das Antigen bilden, sowie die Herstellung des Serums von Kaninchen. Das Immunisierungs-Serum konnte Mäuse und Meer-schweinchen gegen tödliche Dosen des Giftes schützen.

(*) Ospite del Laboratorio di Chimica Terapeutica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Data l'alta frequenza di casi di latrodictismo in Italia, che ha raggiunto la cifra totale di 262 casi durante gli anni 1949-51 ⁽¹⁾, abbiamo ritenuto opportuno intraprendere alcuni studi preliminari, orientativi, sulla preparazione di un siero immune specifico contro il veleno di *L. 13-guttatus*. Sieri specifici antitossici contro il *L. mactans* sono stati preparati prima sul coniglio da TROISE ⁽²⁾ in Francia, poi sul montone da alcune industrie farmaceutiche degli S. U. d'A. in seguito ai lavori sperimentali di D'AMOUR e Coll. ⁽³⁾. Recentemente è stato introdotto in Italia, con buoni risultati, l'uso del gluconato di calcio endovena nella cura di questa sindrome ^(4, 5); tuttavia tale medicamento non può considerarsi come specifico.

ATTIVITÀ DEL VELENO

Preparazione del veleno. — Abbiamo usato materiale raccolto in natura nella zona di Orbetello e materiale allevato in laboratorio (*). Numerose femmine adulte di *L. 13-guttatus* sono state sezionate onde prelevare le ghiandole velenifere. Dopo aver separato il cefalotorace dall'addome e dalle zampe, si asporta il tegumento dorsale del cefalotorace mettendo allo scoperto le due ghiandole velenifere, piriformi, che spiccano sui gruppi muscolari. Afferrando con una pinza il dotto che porta il veleno dalla ghiandola al corrispondente chelicero, si asporta la ghiandola senza spremerne il veleno. Tutte le ghiandole sono state conservate essiccate nel vuoto a 4° C. Al momento dell'uso venivano pesate, con bilancia a torsione sensibile a 0,005 mg, pestate in un mortaio e addizionate di glicerina e soluzione fisiologica in parti uguali. Tale sospensione mantenuta a 4° C, non ha mostrato, anche se usata dopo un mese, una diminuzione del suo potere tossico. Il peso di una coppia di ghiandole essiccate è risultato di 0,10—0,16 mg.

⁽¹⁾ BETTINI S.: Distribuzione dei casi di latrodictismo in Italia durante gli anni 1949-51 (In corso di pubblicazione).

⁽²⁾ TROISE E.: Compt R. Soc. Biol., 99: 1434, 1929.

⁽³⁾ D'AMOUR, BECKER e VAN RIPER: The Black Widow Spider, Quart. Rev. Biol., 11: 123, 1936.

⁽⁴⁾ BETTINI S. e CANTORE G.: Sulla terapia del morso di *Latrodictus 13-guttatus*, ROSSI - Nota I - Su di un caso di latrodictismo trattato con gluconato di calcio endovena. Arch. It. Sc. Med. Trop. Parass., 34 (3): 436, 1935.

⁽⁵⁾ BETTINI S., ANTONINI E. e CANTORE G.: Sulla terapia del morso di *Latrodictus 13-guttatus*, ROSSI - Nota II - Cinque nuovi casi di latrodictismo trattati con gluconato di calcio endovena. (In corso di pubblicazione).

(*) Ringraziamo il tecnico Pierdominici Gaudenzio per il prezioso aiuto fornitoci per quanto riguarda gli allevamenti e la raccolta di ghiandole.

Determinazione della DL50 sul topino (calcolata secondo il metodo di REED e MEUNCH ⁽⁶⁾). — Si sono usati 30 topini di 15 ± 3 g, e la durata dell'esperienza è stata di 24h. Abbiamo preparato una sospensione di ghiandole velenifere della concentrazione di 4 coppie di ghiandole per cm^3 , cioè del peso di $0,450 \text{ mg/cm}^3$.

In base al metodo suddetto, risulta che la DL50 di una sospensione di ghiandole velenifere di *L. 13-guttatus*, in soluzione fisiologica e glicerina è, per il topino, di circa $0,0135 \text{ mg}$ in peso delle ghiandole essiccate (cioè $0,900 \text{ mg/Kg}$).

Nelle prove orientative intese a stabilire la DL50 del veleno nel topino, abbiamo potuto rilevare alcuni dati relativi alla sintomatologia ed anatomo-istopatologia, dati che riteniamo utile qui riportare.

Sintomatologia nel topino. — L'azione del veleno si esplica fino dai primi minuti dall'inoculazione. Gli animali iniziano subito a grattarsi nel punto dell'inoculazione, stanno raccolti a palla, sono agitatissimi, stridono, ballano, presentano turbe motorie a tipo ipercinetico con forti tremori muscolari. Alcuni presentano eretismo, coda alzata, tentano di fuggire in ogni direzione con salti e movimenti incoordinati fino a che iniziano veri fenomeni convulsivi che portano a morte l'animale in circa 10 minuti. In qualche altro caso non si hanno fenomeni eccitativi, bensì depressivi; gli animali sono in fortissima dispnea, immobili, non reagiscono agli stimoli, tentano nascondersi, e muoiono in un periodo più lungo (4-5h) che non quelli che presentano fenomeni eccitativi.

Lesioni anatomo-istopatologiche nel topino. — Data la rapidità con cui agisce il veleno non vi è il tempo necessario per l'istaurarsi di evidenti lesioni micro e macroscopiche. Nelle grandi cavità vi è assenza di essudati e trasudati; tutti gli organi presentano fenomeni congestizio-emorragici, specie il cervello che è fortemente emorragico. In alcuni topini la vescica è fortemente distesa per la forte ritenzione di urina, ed assai emorragica. Nel punto di inoculazione del veleno può esservi edema gelatinoso-emorragico, simil carbonchioso. Con gli organi di animali morti, sia di quelli che hanno presentato forme eccitative, che di quelli che hanno presentato forme depressive, sono stati allestiti preparati istologici. Questi hanno mostrato: vasodilatazione ed emorragie in tutti gli organi, specie nel cervello; nel rene degenerazione torbida a livello dell'epitelio dei tubuli, edema, travaso di albumina. Ciò concorda con quanto ha notato il MARETIC sul topino ⁽⁷⁾.

⁽⁶⁾ REED L. J. e MEUNCH H.: Am. J. Hyg., 72: 493, 1938.

⁽⁷⁾ MARETIC Z.: Beobachtungen über Pathologie und Klinik des Latrodektismus in Istrien. Acta Tropica, 8 (2): 136, 1951.

Determinazione della LD50 sulla cavia. — Si sono usate 30 cavie del peso di 350-400 g, e la durata dell'esperimento è stata di 24 h. Abbiamo preparato una sospensione di ghiandole velenifere ad una concentrazione di 10^{-4} , cioè di 1,6 mg (pari a n. 10 coppie) di ghiandole sospese in 9 cm³ di acqua distillata + 7 cm³ di glicerina neutra. La via di inoculazione è stata quella sottocutanea. Le cavie sono state tenute a digiuno 6 h prima e 6 h dopo l'inoculazione.

La DL50, calcolata secondo il metodo di Reed e Meunch, è risultata essere per le cavie da noi usate di 0,028 mg in peso di ghiandole essiccate, pari a circa 0,075 mg/Kg cavia.

Sintomatologia nella cavia. — Abbiamo potuto osservare che le cavie inoculate con dosi letali presentano in un primo periodo fenomeni eccitativi e grattamento nel punto di inoculazione. Dopo una seconda fase, durante la quale l'animale torna ad essere apparentemente normale, iniziano manifestazioni dispnoiche unite spesso a paralisi degli arti che accompagnano l'animale fino alla morte. Edema del muso. Frequente l'ematuria.

Anatomia patologica nella cavia. — Nulla di rilevante al punto di inoculazione (*). Fenomeni congestizi generali degli organi interni con epato-splenomegalia. Edema polmonare. A volte abbondante ritenzione di urine, e di alimenti nel sacco gastrico.

PRODUZIONE DI UN SIERO IMMUNE E TITOLAZIONE

A) Due conigli del peso rispettivamente di Kg. 1,520 e Kg. 1,600 sono stati inoculati, ogni 6 giorni, per via sottocutanea, con dosi riportate nella nota 2 della Tab. I. Il totale della sostanza ghiandolare inoculata è stato pari a 1,230 mg per animale (cioè 0.818 mg/Kg).

I due animali, 6 giorni dopo l'ultima inoculazione, sono stati salassati in bianco.

Titolazione del siero sul topino. (Tab. I) — Ventuno topini del peso di g 15 ± 3 sono stati divisi in 7 lotti di tre topini ciascuno ed inoculati con 10 DL50 di veleno e contemporaneamente con dosi scalari di siero immune, da 0,05 cm³ fino a 0,50 cm³. Altri due lotti di tre topini ciascuno sono ser-

(*) Se invece il veleno viene inoculato per via intradermica alla dose di 0.020 mg in soluzione fisiologica al 2:10.000, esso causa una flogosi circoscritta più o meno intensa, che raggiunge a volte la necrosi.

TABELLA I

Titolazione dei sieri antitossici su topino ⁽¹⁾

	Peso Topini	Dose veleno inoculata	Dose siero inoculata	Via di somministrazione	Mortalità
Siero N. 1 ⁽²⁾ .	15±3 g	10 LD ⁵⁰	0,05 cm ³	sottocutanea	3/3
»	»	»	0,10 »	»	3/3
»	»	»	0,15 »	»	3/3
»	»	»	0,20 »	»	3/3
»	»	»	0,30 »	»	3/3
»	»	»	0,40 »	»	3/3
»	»	»	0,50 »	»	3/3
Siero N. 2 ⁽²⁾ .	15±3 g	10 LD ⁵⁰	0,05 cm ³	sottocutanea	3/3
»	»	»	0,10 »	»	3/3
»	»	»	0,15 »	»	3/3
»	»	»	0,20 »	»	3/3
»	»	»	0,30 »	»	3/3
»	»	»	0,40 »	»	3/3
»	»	»	0,50 »	»	3/3
Siero N. 3 ⁽³⁾ .	20±3 g	9 LD ⁵⁰	0,10 cm ³	sottocutanea	1/3
»	»	»	0,20 »	»	1/3
»	»	»	0,30 »	»	1/3
Siero N. 4 ⁽³⁾ .	20±3 g	9 LD ⁵⁰	0,10 cm ³	sottocutanea	1/3
»	»	»	0,20 »	»	3/3
»	»	»	0,30 »	»	0/3
Siero N. 5 ⁽³⁾ .	20±3 g	9 LD ⁵⁰	0,10 cm ³	sottocutanea	0/3
»	»	»	0,20 »	»	0/3
»	»	»	0,30 »	»	0/3
Siero normale coniglio . .	20±3 g	9 LD ⁵⁰	0,30 cm ³	sottocutanea	6/6

⁽¹⁾ Durata dell'esperimento h 24.

⁽²⁾ Siero ottenuto da coniglio inoculato ad intervalli di 6 giorni con le seguenti dosi: 0,30, 0,090, 0,175, 0,350, 0,585 mg. Totale 1,230 mg.

⁽³⁾ Siero ottenuto da coniglio inoculato ad intervalli di 5 giorni con le seguenti dosi di veleno: 0,130, 0,260, 0,525, 0,790, 1,585, 1,900, 1,900, 2,000, 2,000, 2,300 mg. Totale 13,390 mg.

viti di controllo; uno è stato inoculato con 10 DL50 + 0,50 cm³ di siero normale di coniglio, l'altro con 0,50 cm³ del siero in esame + glicerina e soluzione fisiologica. Tali prove sono state fatte con i sieri 1 e 2 ottenuti dai due conigli. Nessuno dei due sieri ha dimostrato la benchè minima attività antitossica nei confronti del veleno di ragno, anche alle più alte dosi.

B) Dopo i primi risultati negativi, abbiamo tentato di immunizzare tre conigli del peso di circa 2 Kg con un quantitativo di veleno circa 11 volte maggiore di quello usato nella precedente immunizzazione.

Le inoculazioni nei tre animali sono state praticate sotto cute ad intervalli di 5 giorni e con dosi crescenti di veleno. Complessivamente ogni animale ha subito 10 inoculazioni, ricevendo in peso 13,394 mg di ghiandole essiccate.

Gli animali hanno bene sopportato l'immunizzazione e sono stati salassati in bianco 8 giorni dopo l'ultima inoculazione.

Determinazione della DL50 e titolazione del siero sul topino. — È stata preparata una sospensione di ghiandole seguendo la tecnica sopra descritta. Sono stati usati topini del peso di 20 ± 3 g. La DL50 per questo lotto di topini inoculati con questa nuova sospensione di ghiandole è stata di 0,0096 mg.

Topini di egual peso sono stati inoculati con 9 DL50 del valore testè stabilito, e contemporaneamente con quantità scalari dei tre sieri in esame (0,10 - 0,20 - 0,30 cm³) come risulta dalla Tabella I.

I risultati conseguiti pur tenendo conto dello scarso numero di animali usati, dimostrano che il siero esplica netta e specifica azione antitossica. Il siero N. 5 è risultato il più attivo, esso ha protetto tutti gli animali inoculati, anche quelli con le dosi più basse. I sieri N. 3 e 4 invece, pur dimostrando una innegabile attività antitossica, hanno agito in maniera incompleta.

Titolazione del siero sulla cavia. — Il detto siero immune è stato anche titolato sulla cavia. Abbiamo usato per questi esperimenti un gruppo di cavie provenienti da Castiglion Fiorentino. Un secondo gruppo, proveniente da Torino, si è mostrato assai resistente al veleno di *L. 13-guttatus*, a confronto del primo gruppo.

Sono state eseguite due titolazioni, come da Tab. II. Nelle nostre esperienze abbiamo notato come la cavia sia animale molto sensibile al veleno di *L. 13-guttatus*, e siamo stati quindi costretti ad usare quantitativi modesti di veleno in quanto la cavia intossicata con alte dosi entra

TABELLA II

Titolazione dei sieri antitossici su cavia ⁽¹⁾

	Peso cavie	Dose veleno inoculata	Dose siero inoculata	Vie di somministrazione	Mortalità	
Siero N. 3 . . .	220-260 g	0,200 mg/Kg	2 cm ³	sottocutanea	0/3	
Siero N. 4 . . .	280-330 g	»	2 cm ³	»	0/5	
Siero N. 5 . . .	280-330 g	»	2 cm ³	»	0/5	
Controlli	Siero normale . . .	220-260 g	»	2 cm ³	»	3/3
	—	220-260 g	»	—	»	3/3
	—	280-330 g	»	—	»	2/3
	—	280-330 g	»	—	»	4/4

⁽¹⁾ Durata dell'esperienza 72 h.

nel coma premortale in maniera così rapida da non poter trarre vantaggio dai medicamenti somministrati.

In queste esperienze sono state usate dosi diverse di veleno in relazione al diverso peso degli animali. Tuttavia, da quanto risulta dalla Tabella II, su 13 cavie controllo una sola è sopravvissuta mentre l'attività protettiva del siero è chiaramente dimostrata dalla sopravvivenza totale dei 13 animali trattati. Con questi sieri si sono avuti risultati significativi nonostante che tutte le prove su cavia siano state condotte in maniera non uniforme a causa di vari fattori. Fra essi vanno ricordati: la necessità di aver dovuto impiegare diversi lotti di cavie a presumibile diversa resistenza ed a peso differente; la necessità di aver dovuto usare lotti di ghiandole velenifere non omogenei; la disponibilità di sieri a potere immunizzante presumibilmente diverso (il siero N. 5 ad esempio si è mostrato nelle prove su topini notevolmente più attivo che i sieri N. 3 e 4).

CONCLUSIONI

Si può quindi concludere che nella preparazione di un siero immune che sia in grado di esplicare una attività protettiva su topini e cavie inoculati con dosi mortali di veleno di *L. 13-guttatus*, è indispensabile impiegare forti quantitativi di materiale antigene. Difatti nei primi nostri

tentativi di immunizzazione del coniglio, non siamo riusciti ad ottenere un siero sufficientemente attivo e siamo stati costretti ad aumentare di circa 11 volte (più di 13 mg di ghiandole essiccate per animale) il quantitativo di antigene inoculato in un secondo gruppo di conigli. Con questo metodo, il nuovo siero ha mostrato una netta attività protettiva sui topini e sulle cavie inoculati con dosi mortali di veleno.

L'attività tossica del veleno di *L. 13-guttatus* è pressochè simile, dai risultati da noi ottenuti, a quella di *L. mactans*, come riportato da D'AMOUR e Coll. (3).

Questi primi risultati positivi forniscono alcuni dati orientativi che ci possono indirizzare verso un metodo di preparazione di un siero immune specifico da montone da utilizzarsi nella cura del latrodectismo umano da *L. 13-guttatus*.

Nota. — Al momento della presentazione di questo lavoro leggiamo il lavoro di STANIC sull'immunologia del latrodectismo (*Acta Tropica*, 3: 225, 1953) nel quale viene descritta la preparazione di un siero immune, da montone, che egli ha già provato con successo nella cura di due casi di latrodectismo. Notiamo con soddisfazione che i suoi risultati sperimentali, sebbene ottenuti con altra tecnica, collimano con i nostri per quanto riguarda l'attività terapeutica dei sieri immuni.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di parassitologia e di microbiologia
