

58. ULTRAFILTRAZIONE DELLA TOSSINA E ANATOSSINA DIFTERICA.

Il vaccino antidifterico anatossico è un derivato della tossina specifica e possiede valori e proprietà antigeni, flocculanti ed immunizzanti.

Parecchi metodi permettono di trasformare la tossina difterica in anatossina e quello più in uso è dato dall'azione combinata del formolo con il calore.

Un certo numero di agenti fisici (invecchiamento all'aria, riscaldamento) o di prodotti chimici, riportati da Schmidt ⁽¹⁾ (iodio, aldeidi, etere etilico, alcool etilico, urotropina, idrocarburi varii (pentano, esano, ecc.), composti ciclici, fenolo, resorcina, metalli, formolo, ecc.) hanno la proprietà di rendere la tossina atossica, conservandole il potere antigene.

L'Istituto Sierologico di Stato di Copenaghen nel 1932 studiò circa 200 sostanze differenti, concludendo di aver trovato solamente le aldeidi, le quali distruggono la tossicità della tossina pur rispettandone le altre funzioni specifiche. L'adsorbimento con il carbone, la lecitina, i saponi, secondo Löwenstein ⁽²⁾ agiscono nello stesso modo (cryptotossina di Vincent: tossina + palmitato di sodio). L'azione del formolo che contribuisce a neutralizzare il gruppo tosoforo della tossina è la più notevole di queste azioni e il nuovo prodotto ottenuto viene chiamato anatossina da Ramon ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾, il quale nel 1935 così si esprime: « Nous entrons donc en possession d'une méthode générale permettant de transformer à volonté les antigènes les plus toxiques en antigènes inoffensifs ou, comme nous les avons appelés, en anatoxines, qui pourront être utilisés, soit dans la thérapeutique préventive et même curatives de certaines maladies de l'homme et des animaux ».

In Italia, ove sulla vaccinazione antidifterica è apparso un numero considerevole di pubblicazioni che trattano l'argomento sia dal lato scientifico che dal lato pratico, il metodo è stato applicato in modo ufficiale e nel dicembre del 1929 fu ordinata dal Duce l'organizzazione della vaccinazione antidifterica mercè l'anatossina.

Questa disposizione, che gli stranieri hanno considerato come un modello e che hanno proposto come esempio alle organizzazioni d'igiene dei propri paesi, regola tutte le applicazioni del metodo sia dal punto di vista medico che da quello amministrativo.

Circa l'obbligatorietà della vaccinazione, già sin dal 1930, in alcune Provincie d'Italia (Genova) era stata resa obbligatoria la vaccinazione antidifterica negli asili, nei collegi e nelle scuole per tutti i bambini e ragazzi dai 2 ai 14 anni; inoltre è stato prescritto il certificato di subita vaccinazione antidifterica per tutti coloro che aspiravano ad essere accolti nelle colonie marine e montane.

In varie pubblicazioni R. Maggiora-Vergano ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ ha fatto conoscere la forte diminuzione della morbilità difterica in certe regioni, dove la vaccinazione con l'anatossina difterica è stata applicata largamente. Secondo i suoi rapporti nel 1931 l'anavaccinazione si estendeva a 76 provincie e 162.962 erano stati vaccinati.

Nel 1932 il Congresso Italiano di Pediatria di Perugia ha affermato il valore della profilassi con il metodo della anatossivaccinazione.

Nel 1935 venivano vaccinati più di 250.000 fanciulli con eccellenti risultati.

In quest'anno il Ministero dell'Interno ha reso obbligatoria la vaccinazione con la anatossina difterica, che introdotta nell'organismo lo può rendere più invulnerabile, più forte, ed immune per l'infezione specifica.

Praticamente dunque alla tossina difterica si aggiunge formalina nella proporzione del 3-4 %; si mette la miscela in termostato alla temperatura di 37° C. per 4-6 settimane e si ottiene un prodotto non più tossico, assolutamente innocuo per le cavie, ma che della tossina conserva le proprietà antigeniche e conferisce all'animale (cavia) forte immunità, poichè produce i rispettivi anticorpi.

La modificazione che subisce la tossina per l'influenza del formolo corrispondono alla modificazione dei propri caratteri chimici o fisici?

E' possibile che il formolo eserciti sulla tossina una azione chimica, oppure, come alcuni batteriologi ritengono, la molecola di anatossina sia una molecola di tossina, ingrandita e rigonfiata dal formolo?

In quest'ultimo caso, lo stato fisico della molecola dovrebbe essere modificato, e di ciò ci si può render conto studiando comparativamente la tossina e l'anatossina con i diversi metodi fisico-chimici e in special modo

con l'ultrafiltrazione, utilizzando sacchetti di collodion, i quali furono introdotti in batteriologia nel 1931 da Sanarelli ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾.

Borrel ⁽¹¹⁾, nel 1934, ebbe l'idea di separare, per ultrafiltrazione su sacchetti di collodion in vitro, le tossine tetanica e difterica dai corpi batterici.

Roux, Metchnikoff e Salimbeni-Taurelli ⁽¹²⁾ dimostrarono con l'introduzione dei sacchetti di collodion ripieni di vibrioni colerici, nella cavità peritoneale di animali da esperimento, l'esistenza della tossina colerica ultrafiltrabile.

Però in seguito il metodo fu dimenticato per molto tempo, malgrado che i fisici e i chimici, seguendo le indicazioni di Malfitano ⁽¹³⁾, se ne siano serviti con grande vantaggio per lo studio dei colloidi.

Gli ultrafiltri, più che per lo studio dei virus ultramicroscopici, rendono qualche utile servizio nella ricerca delle tossine. Così lo stesso Bechhold ⁽¹⁴⁾ ha potuto stabilire che mentre la tossina difterica diluita al 10 % passa attraverso l'ultrafiltro senza venire assorbita dalla sostanza dell'ultrafiltro stesso, la stafilolisina invece è in gran parte assorbita.

Le numerose tecniche proposte per la preparazione e il montaggio dei sacchetti di collodion dimostrano come l'operazione sia molto delicata per riuscire allo scopo e si fa notare come, usando collodion rispondente a formole diverse, o facendone variare semplicemente i tempi di disseccamento con i diversi filtri costruiti con lo stesso collodion, si ottengono sacchetti a porosità variabili. L'essenziale è di operare in condizioni comparabili, notando rigorosamente i tempi di disseccamento, altrimenti si ottengono sacchetti che non hanno la stessa porosità nè le stesse proprietà chimico-fisiche. Ed è proprio per questo che la maggior parte delle esperienze di ultrafiltrazione, eseguite su differenti virus non hanno alcun valore essendo i sacchetti di collodion differenti gli uni dagli altri.

Affermare come alcuni AA. fanno, che vi sia passaggio o non passaggio attraverso la membrana di collodion, senza specificare quale porosità abbia la membrana in esperimento, non ha alcun senso. Si deve ricordare che l'ultrafiltrazione eseguita su filtri di collodion, senza precisarne rigorosamente il modo operatorio, appare senza valore, in ragione stessa delle variabilità numerose che entrano in gioco durante la preparazione dei filtri. Inoltre, accade che una serie di ultrafiltri, fabbricati lo stesso giorno con lo stesso procedimento, danno risultati variabili, se non si opera assolutamente in condizioni identiche.

La sterilizzazione degli ultrafiltri costituisce uno dei problemi più delicati della ultrafiltrazione batteriologica e, se non viene eseguita in modo perfetto, induce a numerose cause di errori.

La sterilizzazione degli ultrafiltri di collodion all'autoclave a 120° , a 115° e anche a 110° è impossibile, perchè i sacchetti si rompono facilmente ad ogni piccolo movimento. La sterilizzazione con il vapore di acqua a 100° per 15' minuti è imperfetta e spesso si hanno inquinamenti con le spore di *B. subtilis*. Inoltre, il riscaldamento diminuisce la permeabilità dei sacchetti di collodion, anche quando essi sono immersi nell'acqua durante il riscaldamento.

Si è trovato conveniente far precedere alla sterilizzazione dei sacchetti di collodion nel vapore di alcool la denitratura che presenta il vantaggio di non modificarne la porosità.

Si usa come denitrante una soluzione di solfuro ammonico del commercio diluita con quattro volumi di acqua. Si riempie l'ultrafiltro di collodion con la soluzione di solfuro ammonico tiepido a 40° C. Si immerge il sacchetto in un bagno di solfuro di ammoniaca a 40° , in modo che la denitratura si faccia sulle due pareti dell'ultrafiltro. Si mantiene il bagno di solfuro alla temperatura di 40° per mezz'ora, indi si lava allora l'ultrafiltro con acqua ammoniacale, ed in seguito con acqua distillata. I filtri così denitrati non sono modificati dall'ebollizione. Essi possono essere sterilizzati all'autoclave, a condizione che la pressione non sia superiore a 110° , e conservati a secco. Immersi nell'acqua, essi ridiventano istantaneamente permeabili.

La sterilizzazione dei sacchetti di collodion con il vapore di alcool, presenta il vantaggio di non modificare la porosità di essi, assicurando una sterilizzazione perfetta. La tecnica consigliabile è la seguente: si mette in un piccolo autoclave mezzo litro di alcool a 90° , al posto dell'acqua. Si versa all'interno del sacchetto l'alcool a 80° . Si chiude l'autoclave e si adatta al rubinetto dell'aria dell'autoclave un lungo tubo di gomma, congiunto alla parte superiore di un refrigerante, montato in modo inclinato.

Mentre l'autoclave è in funzione, viene sorvegliata la fuoriuscita dell'aria e si può apprezzare un odore di alcool dal refrigerante. Quando l'alcool comincia a distillare, goccia a goccia, si chiude il rubinetto dell'autoclave. Si sterilizza per mezz'ora a 105° . Terminata la sterilizzazione, si asporta il tubo di gomma, che congiunge l'autoclave con il refrigerante, e si apre il rubinetto dell'aria, quando l'autoclave è raffreddato.

Per evitare ogni fuga di alcool, ci si deve assicurare che il giunto di gomma sia nuovo o in buono stato.

I sacchetti di collodion, così sterilizzati, dovrebbero rispondere a tre condizioni, e cioè:

1) Lo spessore della membrana di collodion dovrebbe essere di 1/100 di millimetro in media.

2) I sacchetti di eguale dimensione e spessore, sottoposti alla medesima pressione e durante lo stesso tempo, devono contenere identico volume di acqua.

3) I controlli di porosità come l'ultrafiltrazione di una soluzione di rosso Congo, o di emoglobina a 1 p. 100, possono servire di indicazione approssimativa della porosità. La molecola di emoglobina sarebbe di 4 a 5 millimicron di diametro. Ma è da ricordarsi che fenomeni di adsorbimento, legati alla carica elettrica delle materie coloranti, intervengono nell'ultrafiltrazione a mezzo del collodion. Per conseguenza, la grandezza degli elementi filtrati indica in modo approssimativo la porosità della membrana di collodion e conviene perciò ricorrere alla filtrazione delle sostanze della tabella di Bechhold. La molecola di tornasole alcalino è ancora più piccola che quella di emoglobina e rappresenta un buon mezzo di controllo. A tale riguardo per misurare il diametro dei pori degli ultrafiltri, Bechhold ha stabilito la seguente tabella, secondo la dimensione delle granulazioni colloidali, in ordine decrescente:

- | | |
|---|---|
| 1. Azzurro di Berlino. | 11. Soluzione di gelatina a 1 p. 100. |
| 2. Soluzione colloidale di platino. | 12. Soluzione di emoglobina a 1 p. 100. |
| 3. Idrosol di ossido di ferro. | 13. Seroalbumina. |
| 4. Caseina (del latte). | 14. Tossina difterica. |
| 5. Idrosol di solfuro di arsenico. | 15. Protoalbumosa. |
| 6. Soluzione colloidale di oro (40 m. Zsigmondy n. 4). | 16. Silice colloidale. |
| 7. Ossido di Bi colloidale (Bismon). | 17. Lisalbinacido. |
| 8. Lisargina (argento colloidale). | 18. Deutorosalbumosa A. |
| 9. Collargolo (argento colloidale 20 micron-micron = un milionesimo di millimetro). | 19. Deutorosalbumosa B. |
| 10. Oro colloidale (Zsigmondy n. 0,1 - 4 micron-micron). | 20. Deutorosalbumosa C. |
| | 21. Tornasole. |
| | 22. Destrina. |
| | 23. Cristalloidi, in genere. |

Teoricamente l'ultrafiltrazione può servire a misurare le dimensioni degli ultravirus e conoscendo le dimensioni dei pori, supponendo ancora che essi siano tutti uguali tra loro, si dedurrebbe la dimensione dell'ultravirus filtrato.

Trai vari metodi proposti: metodo della permeabilità per l'aria, metodo della filtrazione delle emulsioni, metodo della filtrazione dell'acqua, metodo alla emoglobina di Bechhold, i due ultimi sono da preferirsi.

I filtri batterici utilizzati ordinariamente sono costituiti o di materia silicea a carica elettrica negativa o di miscela di carbonato di calcio e di carbonato di magnesio a carica elettrica positiva. Con questi ultimi filtri si arrestano i batteri, i virus e i colloidi (vaccino, mosaico del tabacco, batteriofago, tossina difterica, tetanica, botulinica, rosso Congo, ecc.), che sono stati classificati come filtrabili sino al 1927, prima delle esperienze di Kramer (¹⁵).

La membrana di collodion ha anche essa una carica elettrica, ma nella ultrafiltrazione su collodion i fenomeni di carica elettrica e di adsorbimento hanno una importanza minima.

Si dovrà dunque sempre preferire, ogni qual volta sarà possibile, l'ultrafiltrazione alla filtrazione ed è interessante studiare ora per ora o giorno per giorno i prodotti solubili microbici (tossine, antivirus, tubercoline, ecc.) e alcuni virus, eseguendo ultrafiltrazioni mediante sacchetti di collodion.

Nel corso della ultrafiltrazione poi è necessario seguire queste tre regole, e cioè:

1) Il liquido da filtrare deve essere il più limpido possibile; meno è viscoso e meglio filtra.

2) Bisogna sempre osservare se la reazione è acida o alcalina, ricordando che l'alcalinità facilita la filtrazione in generale e l'acidità, anche minima, intacca le membrane di collodio. Si nota la viscosità del liquido, la durata dell'operazione e la temperatura del liquido.

3) Infine, il filtrato viene provato come cultura in termostato e come prova biologica, inoculando agli animali una grande quantità di liquido, perchè talvolta gli elementi ultrafiltrabili attraversano la membrana in piccola quantità.

La ultrafiltrazione è un metodo che rende grandi servigi per lo studio degli ultravirus; essa è un mezzo di separazione degli ultravirus e dei prodotti solubili microbici.

Il passaggio per le membrane di collodion è più facile, più regolare e le ricerche in genere si dovrebbero iniziare sempre con tentativi iniziali.

L'ultrafiltrazione permette dunque di separare gli ultravirus e di cercare quali sono le dimensioni degli ultravirus.

Tuttavia si può affermare che molte esperienze sono senza valore, perchè, essendo state eseguite da batteriologi diversi, con sacchetti di collodion preparati con metodi differenti, e avendo porosità variabili, i risultati ottenuti sono ben lungi dall'essere paragonabili tra loro.

L'ultrafiltrazione viene applicata allo studio delle tossine microbiche, delle diastasi, dei proteidi, ecc. Disciolti nella soluzione fisiologica i proteidi sono ritenuti sugli ultrafiltri, che lasciano passare il cloruro di sodio, e la caseina può essere separata con la ultrafiltrazione dei cristalloidi del latte.

Le Guyon ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾ ha eseguito numerose ricerche relativamente all'azione del formolo sulla tossina nella sua derivazione in anatossina, e si domanda se, in tali modificazioni subite per il formolo, in molecola di anatossina non sia che la molecola di tossina rigonfiata e ingrandita dal formolo.

Lo stesso viene confermato da Lépine ⁽¹⁹⁾ con una serie di esperienze in vitro e in vivo, seguendo l'indirizzo sperimentale di Rivers ⁽²⁰⁾ sui colloidi e i virus filtrabili e di Hauderoy ⁽²¹⁾ sugli ultravirus.

Non si ha qui l'intenzione di enumerare le esperienze eseguite da numerosi batteriologi che si sono occupati della ultrafiltrazione e si preferisce di riportare solamente qualche esperimento comparativo sulla ultrafiltrazione della tossina e della anatossina difterica. Mediante l'uso dei sacchetti di collodion è stata titolata la tossina difterica con il metodo di Ehrlich. Il suo titolo è di 700 unità. La tossina e l'anatossina difterica non diluite ed ultrafiltrate con gli ultrafiltri di collodio della stessa porosità passano attraverso tali membrane ultrafiltranti.

Così in queste esperienze la tossina difterica non diluita, ultrafiltrata, uccide le cavie in meno di 24 ore nella stessa durata di tempo che la stessa tossina pura non ultrafiltrata. A partire da 1/400, essa non uccide i suddetti animali.

L'esperienza sull'anatossina ultrafiltrata e non ultrafiltrata ha egualmente richiesto due gruppi di cavie. Il primo gruppo di cavie controllo riceve tre volte di seguito, a 18 giorni di intervallo, 1 cmc. di anatossina, titolando 16 unità anatossiche. Dopo questo tempo, le suddette cavie vengono vaccinate, e sopportano l'inoculazione di 1 cmc. di tossina non diluita, cioè 700 unità tossiche di Ehrlich.

Un secondo gruppo di cavie è vaccinato nelle stesse condizioni e nello stesso spazio di tempo con l'anatossina non diluita, ultrafiltrata su sacchetti di collodion sufficientemente resistenti, avendo la stessa porosità che gli ultrafiltri di collodion, che sono stati usati per la ultrafiltrazione della tossina difterica.

Questo secondo gruppo di cavie vaccinate con l'anatossina ultrafiltrata ha ricevuto, lo stesso giorno che il gruppo di cavie-controllo, 1 cmc. di tossina difterica non diluita e non ultrafiltrata. Tutte le cavie sono sopravvissute alla inoculazione di 700 unità tossiche di Ehrlich.

Da queste esperienze risulta che la tossina e l'anatossina difterica non diluita, ultrafiltrate su ultrafiltri di collodion, della stessa porosità (e abbastanza resistenti per ritenere queste tossine a partire dalla diluizione a 1/400) passano attraverso queste membrane ultrafiltranti, nelle stesse condizioni sperimentali.

Gli ultrafiltri, impiegati nella suddetta esperienza, lasciano passare il tornasole alcalino e ritengono l'emoglobina. Ora, secondo la precedente tabella di Bechhold, la grandezza delle molecole della tossina difterica è inferiore a quella della emoglobina e superiore a quella del tornasole.

Se la molecola di anatossina è più grande che la molecola di tossina, l'anatossina dovrebbe avere un diametro sensibilmente uguale o superiore alla molecola della emoglobina e dovrebbe essere ritenuta sugli ultrafiltri.

Per conseguenza si può dire che l'anatossina ha una grandezza molecolare quasi uguale a quella della tossina difterica.

In queste condizioni sembra che il formolo non faccia subire alla tossina difterica un cambiamento dei suoi caratteri fisici (grossezza molecolare particolarmente) rendendola atossica. Invece si può supporre che il formolo agisce sui gruppi aminici della tossina.

Con altra serie di indagini sperimentali si è potuto osservare che la tossina difterica, sia normale che ultrafiltrata, non cambia le sue singole proprietà chimico-fisiche, sierologiche e biologiche.

Lo stesso si può affermare per l'anatossina difterica, sia normale che ultrafiltrata, la quale conserva intatte le sue principali proprietà, che si riferiscono alla innocuità, al potere antigene intrinseco, alla flocculazione e all'attività immunizzante.

Anche altre proprietà dell'anatossina difterica, che non hanno subito variazioni con l'ultrafiltrazione, sono la irreversibilità, e cioè che l'anatossina non può ridivenire tossina nell'organismo vivente, e la stabilità, per cui anche se conservata per due anni circa alla temperatura del frigorifero ($+ 1^{\circ}$ e $+ 5^{\circ}$), conferisce l'immunizzazione ai soggetti vaccinati.

Infine un'altra proprietà della anatossina difterica, ultrafiltrata, è quella di produrre l'antitossina, e cioè un siero antidifterico specifico nell'animale.

Così si è potuto trovare con una serie di indagini di laboratorio che le proprietà flocculanti ed immunizzanti della anatossina ultrafiltrata sono sensibilmente e praticamente equivalenti a quelle che si ottengono adoperando l'anatossina difterica normale.

Concludendo, si ritiene necessario per l'ultrafiltrazione un metodo semplice, rapido e preciso, che permette di ottenere un gran numero di ultrafiltri di collodion, quasi identici tra loro e capaci di dare risultati omogenei.

La ultrafiltrazione dimostra come la tossina e il vaccino difterico anatossico hanno la stessa grandezza molecolare, per cui non si determina con l'uso del formolo alcun cambiamento dello stato fisico della molecola della tossina difterica che diviene atossica, e cioè si trasforma in anatossina. Invece si può ritenere che il formolo agisce sui gruppi aminici della tossina difterica.

La tossina e l'anatossina difterica, sia normali che ultrafiltrate, non modificano i propri caratteri fisico-chimici, sierologici, biologici ed immunizzanti.

Tali le modificazioni e i perfezionamenti apportati alla anavaccinazione contro la difterite che, per essere una infezione grave, ha attirato così estesamente l'attenzione degli scienziati ed ha dato luogo a numerose osservazioni in tutto il mondo.

E' difficile prevedere fin dove potranno portare questi studi, ma, quantunque essi non abbiano ancora oggi oltrepassato il vero periodo di

revisione, già si mostrano pieni d'interesse per le ricerche scientifiche e per le applicazioni pratiche.

RIASSUNTO

La ultrafiltrazione dimostra come la tossina e l'anatossina difterica hanno quasi la stessa dimensione molecolare, e, per conseguenza il formolo non esercita alcun cambiamento fisico sulla molecola della tossina difterica rendendola atossica; invece si ritiene che il formolo agisce sui gruppi aminici della tossina difterica.

La tossina e l'anatossina difterica, sia normali che ultrafiltrate, non modificano le loro proprietà fisico-chimiche, sierologiche e biologiche.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) S. SCHMIDT. - Ann. Inst. Pasteur, 51, 304 (1933).
- (²) E. LÖWENSTEIN. - Centr. f. Bakter., 86, 572 (1921).
- (³) G. RAMON. - C. R. Soc. Biol., 176, 167 (1923).
- (⁴) G. RAMON. - C. R. Acc. des Sciences, 176, 267 (1923).
- (⁵) G. RAMON. - Ann. Inst. Pasteur, 38, 1 (1924).
- (⁶) R. MAGGIORA-VERGANO. - Boll. Sez. Med. Ital. - Soc. Intern. di Microbiologia, fasc. VII-VIII, 409 (1931).
- (⁷) R. MAGGIORA-VERGANO. - Boll. Soc. Ital. Pediatria, fasc. VII, 18 (1932).
- (⁸) G. SANARELLI. - Rif. Med., 1, 231 (1891).
- (⁹) G. SANARELLI. - Centr. f. Bakter., 9, 193 (1891).
- (¹⁰) G. SANARELLI. - Ann. Inst. Pasteur, 12, 225 (1893).
- (¹¹) C. BORREL. - C. R. Soc. Biol., 56, 24 (1904).
- (¹²) E. ROUX, EL. METCHNIKOFF e SALIMBENI-TAURELLI. - Ann. Inst. Pasteur, 10, 257 (1896).
- (¹³) G. E. MALFITANO. - C. R. Acc. des Sciences, 139, II, 920 (1904).
- (¹⁴) H. BECHHOLD. - Centr. f. Bakt., 84, 47 (1927).
- (¹⁵) C. CRAMER. - Journal of infect. diseases, 41, 328 (1927).
- (¹⁶) R. F. LE GUYON. - C. R. Soc. Biol., 103, 715 (1930).
- (¹⁷) R. F. LE GUYON. - C. R. Soc. Biol., 126, 718 (1937).
- (¹⁸) R. F. LE GUYON. - C. R. Soc. Biol., 111, 1008 (1932).
- (¹⁹) P. LÉPINE. - C. R. Soc. Biol., 104, 385 (1930).
- (²⁰) A. RIVERS. - « Filterable viruses », Baillière e Tyndall, Londra (1928).
- (²¹) C. HAUDEROW. - « Les ultravirus », Masson, Parigi (1929).

