

LA CELLULA FOTOELETTRICA E SUE APPLICAZIONI NEL DOSAGGIO DEI VACCINI BATTERICI.

Nella preparazione dei vaccini batterici oltre alla scelta dello stipe, del terreno di sviluppo, della temperatura, del metodo di raccolta, del liquido di sospensione, ecc., si presenta un quesito che ha una importanza pratica non indifferente e che, a dir vero, non è ancora stato risolto in modo definitivo, perchè sebbene siano stati proposti numerosi metodi basati su principii diversi, nessuno di essi fino ad ora ha corrisposto completamente allo scopo. Si tratta dunque di determinare con una certa esattezza il quantitativo di germi contenuto in un vaccino batterico, quantitativo che per molti vaccini viene riferito ad un c.c. di sospensione in soluzione fisiologica (al 0,85 %) e formolata (al 4 ‰).

Da parecchio tempo è stata sentita la necessità di uniformare i metodi di tale determinazione e possibilmente di ridurli ad uno solo, in modo che se vi possono essere differenze di computo, dovute come è noto a fattori diversi, esse vengano ridotte al minimo possibile, onde evitare che nella pratica si abbiano di uno stesso vaccino fiale a contenuto batterico diverso per una stessa partita, ed uno scarto in contenuto batterico superiore al 10 %.

Recentemente C. Callerio ha riassunto i varii metodi più comunemente usati per il conteggio dei germi contenuti nei vaccini. Egli divide pertanto in diversi gruppi tali metodi, alcuni dei quali ormai dimenticati, altri ancora in uso nella pratica corrente.

Ricorderemo come questi metodi possano essere riuniti nei seguenti gruppi aventi per base: 1) il metodo ponderale; 2) il metodo della numerazione al microscopio; 3) il metodo colturale con le diluizioni; 4) il metodo opacimetrico.

Al primo gruppo appartengono: il metodo della pesata dei germi allo stato secco od umido, riferiti ad un c.c. di vaccino e quello dell'ansa calibrata per il dosaggio delle patine batteriche.

Al secondo gruppo quello della numerazione al microscopio con le comuni camere contaglobuli o contabatteri, sia che si faccia l'osservazione al microscopio con condensatori a luce diretta, sia che si ricorra a speciali condensatori a luce indiretta per l'osservazione in campo oscuro (Präparier-Kondensor) di Zeiss proposto da Péterfi ed altri con cella Thomas-Zeiss o di Bürker.

Al terzo gruppo i metodi che sono basati sulle diluizioni delle emulsioni di batteri viventi e relative semine sugli opportuni terreni nutritivi, seguite dal conteggio delle colonie.

Al quarto gruppo i metodi opacimetrici basati sull'uso di apparecchi atti a determinare l'opacità dei vaccini in rapporto al quantitativo dei germi in essi contenuto.

Fra questi ha avuto una estesa applicazione pratica per la sua semplicità l'apparecchio Wellcome, che è basato sul confronto fra sospensioni il cui contenuto in germi è noto e quelle nelle quali deve essere determinato. Questo mezzo, pur non essendo esattissimo, tuttavia ci permette di stabilire, con uno scarto non superiore al $1/10$, il quantitativo di germi contenuto in un c.c.

E' stato anche tentato dal dott. La Parola, del Laboratorio Chimico dell'Istituto di Sanità Pubblica, il dosaggio del contenuto batterico di un idrovaccino con metodo relativamente semplice e rapido, mediante la determinazione delle sostanze organiche nelle migliori condizioni sperimentali per la rapida e completa ossidazione di esse. Purtroppo, dopo una numerosa serie di pazienti e ripetute esperienze, il La Parola è venuto alla conclusione che nel controllo dei vaccini batterici il metodo chimico non corrisponde con la esattezza che sarebbe desiderabile al fine di determinare il numero dei germi, perchè vi sono molti elementi variabili.

Pur seguendo per ora il metodo opacimetrico Wellcome, come uno dei più rapidi e dei più semplici, sebbene non esattissimo, abbiamo rivolto la nostra attenzione a qualche altro mezzo ed abbiamo preso in esame

la possibilità della utilizzazione della cellula fotoelettrica per il dosaggio opacimetrico dei vaccini.

Accenneremo subito al fatto che anche questo metodo non è esente da errori, ma nel caso nostro, pur essendo desiderabile la maggiore esattezza, dobbiamo purtroppo accontentarci del metodo che comporta il minore scarto. A questo proposito ricorderemo che M. J. Renaudin al V Congresso di Chimica biologica, tenutosi a Bruxelles, 23-25 ottobre 1935, ha riferito sui dosaggi opacimetrici in Biologia mediante la cellula fotoelettrica, rilevandone le eventuali cause di errore che sono inerenti alla stessa cellula fotoelettrica, alla differenza di grossezza delle particelle in sospensione ed alla composizione del liquido di sospensione.

E' bensì vero che il Renaudin si riferisce al caso di dosaggi di costituenti minerali in soluzioni, ma altrettanto non si può dire per il dosaggio di sospensioni batteriche, come nel caso nostro, in cui l'eccipiente è una soluzione di concentrazione costante di cloruro sodico e sempre con lo stesso materiale in sospensione. Quindi se errore vi è, esso rimane costante ed una volta tarato l'apparecchio per le singole concentrazioni di materiale finemente sospeso, il giudizio di opacità viene ad essere costantemente influenzato dalla stessa causa di errore della quale va tenuto il debito conto.

Numerose e svariate altre applicazioni pratiche ha avuto la cellula fotoelettrica, come ad es. per determinare il grado di opacità della carta (C. Roy-Pochon).

Thr. Kofman ha studiato la possibilità di usare la cellula fotoelettrica all'ossido di rame per il conteggio del numero dei globuli del sangue e per la valutazione della flocculazione di alcune proteine in funzione della temperatura.

R. Jonnard e F. Stutinski hanno usato la cellula all'ossido di rame per determinazioni delle soluzioni saline, sospensioni colloidali e liquidi biologici.

P. Meunier ha dosato l'alluminio presente in tessuti animali e vegetali per opacimetria.

Tentativi di dosaggi con la cellula fotoelettrica sono stati fatti anche in altri campi, con esiti non sempre concordi e che noi omettiamo per brevità.

Il tipo di apparecchio da noi usato, di cui si unisce una fotografia, è stato allestito utilizzando materiali di diversa provenienza e messa a punto con i mezzi dell'Istituto (vedi fig. 1).

L'apparecchio è costituito da un piccolo proiettore provvisto di una lampada di 50 K., tale proiettore può essere spostato a volontà. Al di sotto del proiettore portalampada ed a breve distanza vi è un cilindro metallico che nella sua parte superiore ha un disco con apertura circolare di diametro alquanto inferiore a quello della vaschetta contenente il vaccino da dosare.

Detto cilindro, munito di un coperchio, serve a proteggere dalla luce ambiente la cellula fotoelettrica che è applicata nella sua parte inferiore ad un braccio della colonna ed è sostenuta da un portalam-pade.

La cellula fotoelettrica da noi adoperata è una Weston Photronic al ferro-selenio.

La vaschetta contenente il vaccino è costituita da un anello di ebanite filettato all'esterno, sul quale si adattano due anelli pure di ebanite, i quali servono a trattenere in sito due dischi di vetro, che completano la vaschetta. Lo spessore di tutte le vaschette è costante ed è di 7 m/m. (fig. 2).

La forza elettro-motrice generata dalla cellula fotoelettrica è in rapporto alla intensità maggiore o minore di luce che passa attraverso la

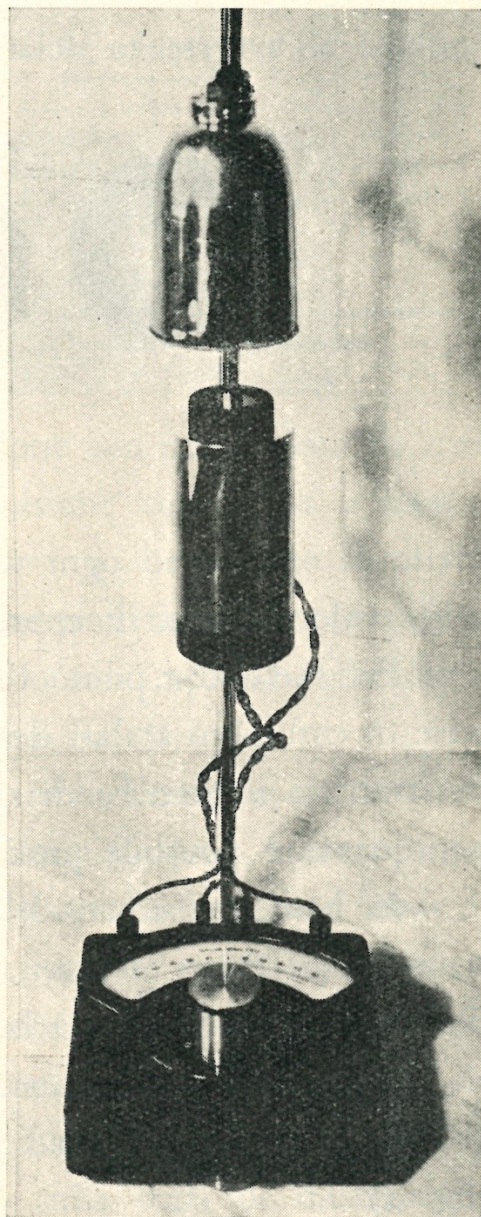


FIG. 1.

vaschetta contenente il vaccino è misurata da un galvanometro. La quantità di luce è in ragione inversa all'opacità del vaccino in esame.

Per il funzionamento dell'apparecchio abbiamo usato una batteria di accumulatori; si è ricorso alla corrente continua per evitare le variazioni alla quale è soggetta l'energia della rete urbana.

Si ottiene così nella lampadina un'intensità luminosa costante che, insieme all'avvertenza della posizione fissa della lampadina stessa, per-

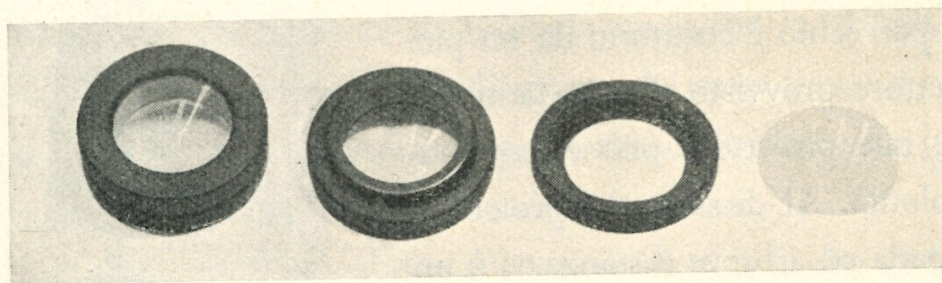


FIG. 2.

mette di ovviare ad ogni variazione di flusso luminoso, che determinerebbe valori diversi di apprezzamento nelle successive determinazioni.

Per mettere a punto l'apparecchio occorre avere a disposizione una serie di emulsioni scalari dei vari vaccini dei quali è stato in precedenza determinato il numero dei germi per ogni cc. e controllati con metodi per quanto è possibile precisi (conteggio, culture per diluizione, ecc.).

In base ai risultati delle determinazioni di opacimetria si costituiscono, con i valori ottenuti, delle grafiche che rappresentano l'andamento delle variazioni di opacità in rapporto al numero di germi (fig. 3).

Le grafiche così ottenute servono di norma per determinare i singoli valori in rapporto ad ogni diluizione ed a ciascun tipo di germi (fig. 4).

Si può anche allestire con lo stesso procedimento una serie di dischi di materiale di opacità diversa quali termini di paragone per il dosaggio corrente delle singole emulsioni batteriche.

Volendo eseguire una determinazione di opacità di un dato vaccino in esame, si procede nel seguente modo.

Disponendo dell'apparecchio, messo a punto come sopra si è detto, si riempie di vaccino la vaschetta facendo attenzione che non vi siano

bolle d'aria eventualmente formatesi per l'applicazione in posto del secondo disco di vetro; chiusa la vaschetta si pone al posto di osservazione. Mediante il commutatore della batteria di accumulatori si accende la lampadina; la luce attraversando lo strato di vaccino verrà in parte assorbita dalla emulsione batterica, la rimanente luce colpisce la cellula fotoelettrica e fa deviare di un certo numero di gradi l'indice del galvanometro.

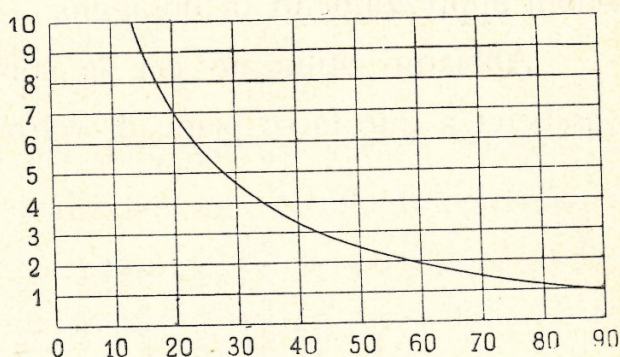


FIG. 3.

Valore nefelometrico dalla scala convenzionale
e valore indicato del galvanometro.

Dal grado di deviazione dell'ago del galvanometro si determinerà l'opacità e quindi di contenuto in germi, sia paragonando tale deviazione con quella data da una

dei dischi campione che corrisponda all'emulsione voluta, sia a mezzo della grafica fig. 4.

Da numerose determinazioni eseguite, con emulsioni varie di germi, si è potuto stabilire la praticità dell'apparecchio e la rapidità delle determinazioni, non influenzate da alcun elemento subiettivo.

A questo riguardo l'impiego della cellula fotoelettrica si rende tanto più utile, quando si tratta di tarare vaccini curativi, i quali, come è noto, sono di opacità molto tenue, per il loro contenuto relativamente basso di germi, mentre il loro apprezzamento ad occhio con emulsioni di paragone diventa molto difficile e quindi soggetto a facile cause di errore. Con l'impiego della cellula fotoelettrica viene ad essere ovviato a tale inconveniente, in quanto le gradazioni di lieve opacità corrispondono ad ampie deviazioni dell'ago del galvanometro sulla scala di misurazione (vedi fig. 3).

Fra i vari tipi di nefelometri proposti, riteniamo che l'apparecchio da noi descritto risponda nel miglior modo ai requisiti richiesti, per essere più semplice in confronto a quelli basati sulle due cellule fotoelettriche contrapposte, nei quali l'impiego di due vaschette, una con l'emulsione in esame e l'altra con l'emulsione campione, può dare risultati meno esatti, per la difficoltà di avere due vaschette assolutamente uguali.

Abbiamo preferito usare l'energia ottenuta da una batteria di accumulatori perchè, come si è detto, ci assicura una maggiore costanza di intensità della sorgente luminosa, che è elemento indispensabile per i buoni apprezzamenti di dosaggio.

Abbiamo utilizzato per la confezione del vaccino da dosare una vaschetta a due facce piane di vetro calibrato in modo da permettere il

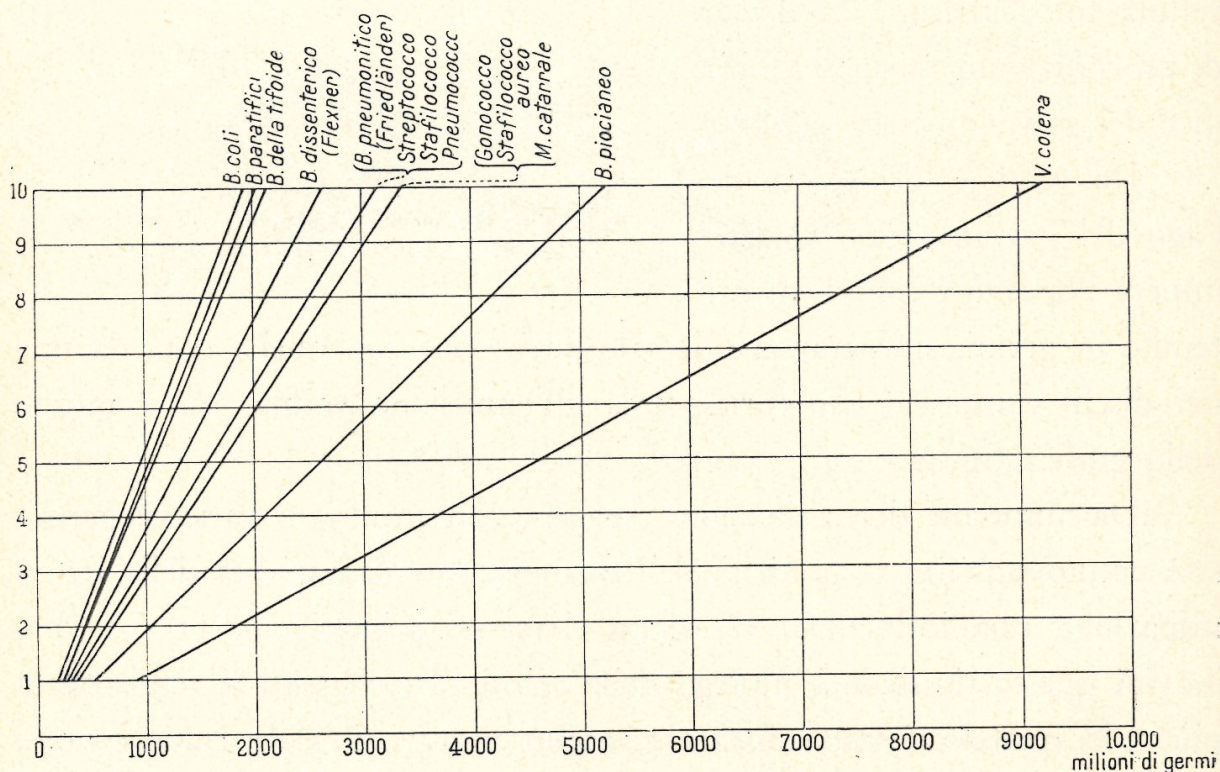


FIG. 4.

Valori nefelometrici in funzione del numero dei germi per cm³.

passaggio regolare ed uniforme della luce attraverso il liquido da dosare e la proiezione di essa sulla cellula fotoelettrica.

Altra norma da seguire è quella di usare, come noi abbiamo fatto, uno strumento di misura molto sensibile, in modo da esporre la cellula sempre a debole illuminazione e per il minimo tempo possibile, onde evitare fenomeni di stanchezza della cellula stessa.

Sperimentando con queste avvertenze abbiamo potuto rilevare che le emulsioni eguali hanno sempre dato le stesse indicazioni, e pertanto riteniamo che l'uso dell'apparecchio da noi proposto per la determina-

zione della opacimetria dei vaccini, risponda in modo conveniente sia per la rapidità che per la precisione dei risultati.

RIASSUNTO

Per eliminare cause di errore nel dosaggio dei vaccini batterici gli AA. hanno ritenuto opportuno di utilizzare una cellula fotoelettrica, la cui alta sensibilità permette l'apprezzamento anche di variazioni di lieve torbidità, le quali invece possono facilmente sfuggire all'occhio dell'analizzatore.

Fra i vari tipi di nefelometri sino ad ora proposti, gli AA. ritengono che l'apparecchio da loro descritto risponda nel miglior modo ai requisiti richiesti, perchè in esso sono state prese tutte le precauzioni per avere unitamente ad un'elevata sensibilità, l'eliminazione degli errori dovuti a stanchezza della cellula e all'incostanza della sorgente luminosa.

Gli AA. dopo avere fatto la descrizione dell'apparecchio, danno le norme per il suo funzionamento e due grafiche: la prima per dimostrare i rapporti esistenti fra il valore nefelometrico della scala convenzionale ed il valore indicato dal galvanometro; la seconda per rappresentare i valori nefelometrici in funzione del numero e della qualità dei germi per cm³.

L'apparecchio controllato con stipiti vari di germi, ha dato ottimi risultati, si è dimostrato inoltre di uso semplice e pratico e tale che in breve tempo si possono eseguire numerosi dosaggi.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia. 1937-XV.

BIBLIOGRAFIA

1. CALLERIO C. - « Contributo allo studio della numerazione dei germi nei vaccini » - Rivista di Bioterapia e Immunologia, Napoli, Anno XIV, 1, 7 (1935).
2. PETERFI T. - « Mikrurgische Methodik »; ABDERHALDEN's - Handb. d. biol. Arbeit-smeth. Abt. V, Teil 2, Heft 5. Lgf. 124 (1924), cit. da C. CALLERIO.
3. RENAUDIN M. J. - « Dosages opacimétriques par la cellule photo-électrique en biologie » - Bull. de la Soc. de Chimie biologique. T. XVIII, n. 2, Février 1936.

4. JONNARD R. e STUTINSKI E. - « Mesures néphélométriques par la cellule a l'oxyde de cuivre » - Compt. Rend. Soc. Biol. T. CXII, 11, 1023 (1933).
5. MEUNIER P. - « Recherches analytiques sur l'alluminium des tissus animaux » - Thèse Sciences, Paris, 1936.
6. ROY-POCHON C. - « Les cellules photo-électriques. caractéristiques et applications » - E. Chiron, Paris, 1932.
7. KOFMAN TH. - « Application de la cellule photo-électrique à l'oxyde de cuivre pour la colorimétrie du sang » - Compt. Rend. Soc. Biol., T. CXII, 5, 431 (1935).
8. KOFMAN TH. - « Sur la néphélométrie au moyen de la cellule photo-électrique a l'oxyde de cuivre » - Ibidem, 478.

