

INFLUENZA DEL PEPTONE
SULL'ATTIVITÀ DELLA TOSSINA TETANICA.

Condrea e Poenaru (¹) affermano che diluendo una tossina tetanica — sia liquida che in polvere — con diversi liquidi, il suo titolo tossico varia secondo il liquido impiegato per la diluizione e precisamente che la tossina diluita con brodo ha un titolo tossico molto più elevato di quella diluita con acqua distillata o soluzione fisiologica.

I due Autori rumeni hanno, poi, cercato di stabilire quale elemento del brodo determina il fenomeno e hanno constatato come questo elemento sia il peptone.

In un successivo lavoro, Condrea e Poenaru (²) studiano in particolare l'influenza del peptone sull'attività della tossina tetanica e osservano come l'aumento del titolo tossico vari col variare della tossina impiegata, ma aumenti in ogni caso da un minimo del 50 per 100 a un massimo del 600 per 100 rispetto al titolo tossico della stessa tossina diluita in acqua distillata, invece che in acqua peptonata all'1 per 100, a condizione di adoperare una tossina il cui titolo tossico, per il topo, sia inferiore a 1:20.000.

Sul principio i due Autori supposero che queste differenze di tossicità fossero dovute a una degradazione rapida della tossina tetanica sotto l'influenza delle grandi diluizioni in acqua distillata; ma dovettero ritirarsi, poi, dinnanzi alla constatazione che l'aumento del titolo tossico si otteneva ugualmente facendo tutte le successive diluizioni in acqua distillata e soltanto l'ultima in acqua peptonata all'1 %.

Dinnanzi a questi fatti, gli Autori emettono l'ipotesi che la tossina tetanica, oltre la sostanza tossica specifica, contenga un'altra sostanza specifica, non tossica di per sè, ma che lo diverrebbe per mezzo di un'altra sostanza non specifica: il peptone. La nuova sostanza tossica che ne risulta non può essere differenziata dalla tossina tetanica propriamente detta.

Gli Autori, infine, credono che il bacillo tetanico non elabori una tossina nel senso stretto della parola, ma piuttosto una protossina capace

di divenire tossina per l'intervento di un'altra sostanza, non specifica, attivante e indispensabile. Questa sostanza attivante si trova nel brodo utilizzato per la cultura del microbo e sarebbe appunto data dal peptone.

Gli Autori, infine, considerando che l'attivazione della protossina tetanica colla sostanza attivante si effettua immediatamente senza bisogno di incubazione, non credono che la protossina sia un fermento capace di elaborare la tossina a spese di elementi costitutivi del brodo.

Halter (³) riprende nel 1936 le esperienze di Condrea e Poenaru confermandole per quello che riguarda l'aumento del titolo tossico della tossina — sia liquida che secca — diluita in acqua peptonata invece che in soluzione fisiologica. L'Halter non adopera acqua semplice peptonata, come gli Autori rumeni, ma soluzione fisiologica peptonata all'1 %.

Dove, però, l'Autore svizzero non è d'accordo con i rumeni, è nella interpretazione del fenomeno. L'Halter, infatti, dice: la tossina tetanica non viene attivata dal peptone, ma viene attenuata dalla soluzione fisiologica, e ciò per il fatto che questa permette l'ossidazione della tossina mentre l'acqua peptonata no, fissandosi l'ossigeno sul peptone e non sulla tossina.

A sostegno di questa sua tesi, l'Halter fa notare che una tossina diluita in soluzione fisiologica ha il suo potere tossico già diminuito dopo 4 minuti e scomparso dopo 14 ore, mentre una tossina diluita in acqua peptonata conserva immutato il suo potere tossico per circa tre settimane.

D'altro lato, se una tossina tetanica diluita in soluzione fisiologica viene fortemente agitata in un matraccio, dopo un'ora, dice l'Halter, essa perde completamente il suo potere tossico e ciò per il fatto che l'ossigeno dell'aria si è fissato sulla tossina, ossidandola e inattivandola.

L'Halter, che ha avuto il torto di non ripetere questa sua ultima esperienza con la tossina diluita in soluzione fisiologica peptonata, conclude il suo lavoro affermando che il peptone « protegge la tossina ossidabile per mezzo delle sue possibilità ossigeno fissatrici ».

Si capisce facilmente come la constatazione dei fatti or ora esposti potrebbe avere una notevole importanza pratica nella esatta valutazione delle unità immunizzanti di un siero antitetanico, se non si usasse tutto lo stesso mestruo di diluizione.

Confermato, infatti, che una tossina tetanica diluita in acqua peptonata ha un titolo tossico superiore a quello della stessa tossina diluita in soluzione fisiologica, tutti i nostri concetti su d.l.m. e L+ verrebbero ad essere scossi e tutti i nostri calcoli nella determinazione delle U.I. di un siero antitetanico verrebbero a trovarsi errati o, quanto meno, inesatti e imprecisi.

Per questi motivi, noi che, per disposizione di legge, dobbiamo continuamente controllare il contenuto in U.I. di tutti i sieri antitetanici che vengono posti in commercio in Italia, abbiamo voluto vedere quale reale differenza di attività esistesse fra una tossina tetanica diluita in soluzione fisiologica e la stessa tossina diluita in acqua peptonata all' 1 %.

A titolo di orientamento si sono cominciate le esperienze su varie partite di sieri antitetanici giunti a noi per controllo, praticando, contemporaneamente al metodo ufficiale, una seconda determinazione delle U.I. diluendo la tossina tetanica in soluzione fisiologica peptonata all' 1 %, anzichè in soluzione fisiologica semplice, allo scopo di vedere se il peptone facesse o no variare il L+ della tossina impiegata.

La tecnica adottata per la determinazione delle U.I. fu quella di Rosenau-Anderson, modificata da Pergola.

Orbene, in tutte le determinazioni compiute non si è mai avuta differenza alcuna adoperando tossina diluita sia in soluzione fisiologica semplice che in soluzione fisiologica peptonata all' 1 %.

Temendo che un eventuale aumento di tossicità della tossina tetanica in soluzione fisiologica peptonata all' 1 % fosse neutralizzato da un maggior contenuto in U.I. dei sieri in esame (le ditte produttrici sono solite denunciare un numero di U.I. leggermente inferiore a quello realmente contenuto nei sieri) si sono ripetute più volte le prove con siero antitetanico standard di Washington non ottenendo anche con questo alcuna differenza adoperando tossina diluita sia in soluzione fisiologica semplice che in soluzione fisiologica peptonata.

La d.l.m. per la cavia della tossina impiegata era di gr. 0,000025 e il suo L+ di gr. 0,005.

Dal risultato di queste prime ricerche ci si veniva a convincere che la presenza del peptone nel mestruo di diluizione di una tossina tetanica

ad alto titolo tossico non ha nessuna influenza sul suo L+ che resta invariato, almeno per il tempo occorrente all'espletamento delle prove.

Si sono proseguite, allora, le ricerche per vedere se il peptone avesse o no influenza sulla d.l.m. di una tossina tetanica.

Avendo Condrea e Poenaru sperimentato con acqua peptonata e Halter con soluzione fisiologica peptonata, si sono adottate le due tecniche.

Preso, dunque, la stessa tossina di cui all'esperienza precedente, se ne pesò una certa quantità e la si diluì in maniera da avere 1 d.l.m. in 1 cc.

Ecco il calcolo da fare per ottenere ciò:

$$1 : d.l.m. = x : p \quad x = \frac{p}{d.l.m.}$$

in cui p è il peso della tossina e $d.l.m.$ il valore di una dose letale minima; x sarà la quantità di liquido da aggiungere per avere una d.l.m. di tossina per centimetro cubo.

Si allestirono, così, tre diluizioni: una in soluzione fisiologica, una in soluzione fisiologica peptonata all'1% e una in acqua peptonata all'1% e si inocularono, quindi, tre lotti di cavie con dosi varie di tossina e precisamente con 1, 1/2, 1/10, 1/20 d.l.m. ottenendo i seguenti risultati:

TABELLA I.

Tossina secca inoculata d. l. m. (per cavia)	Soluzione fisiologica		Soluzione fisiologica peptonata		Acqua peptonata	
	Peso cavia gr.	Esito	Peso cavia gr.	Esito	Peso cavia gr.	Esito
1	335	† in 4 ^o giorno	350	† in 4 ^o giorno	345	† in 4 ^o giorno
1	355	» »	345	» »	350	» »
1	350	» »	355	» »	350	» »
1/2	365	† in 6 ^o giorno	335	† in 6 ^o giorno	355	† in 6 ^o giorno
1/2	345	» »	350	» »	365	» »
1/2	350	» »	350	» »	350	» »
1/10	345	† in 8 ^o giorno	360	† in 8 ^o giorno	340	† in 8 ^o giorno
1/10	360	» »	350	» »	350	» »
1/10	350	» »	340	» »	355	» »
1/20	350	tetano locale grave	355	tetano locale grave	345	tetano locale grave
1/20	355	» »	345	» »	360	» »
1/20	345	† in 9 ^o giorno	345	† in 10 ^o giorno	350	» »

Come si vede le tre diluizioni si sono comportate in maniera pressochè simile tra loro, e le poche differenze rimarcate nell'inoculazione di 1/20 di d.l.m. sono da imputarsi a particolare sensibilità individuale dei singoli animali impiegati e non hanno nulla a che vedere con il mestruo di diluizione utilizzato e, tanto meno, con il peptone.

Data la discordanza dei risultati ottenuti con quelli degli Autori citati, si sono ripetute le esperienze mettendosi nelle loro stesse condizioni. Essi, infatti, sperimentarono con topi, mentre noi avevamo utilizzato cavie.

Si allestì, così, un'altra serie di ricerche impiegando due nuove tossine: una secca la cui d.l.m., per la cavia, era di gr. 0,000003 ed una liquida preparata di fresco e la cui d.l.m., per la cavia, era di cc. 0,0001.

Come animali, si impiegarono in questa serie cavie, ratti e topi.

I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle II e III.

Anche da questa nuova serie di esperienze risulta, quindi, che la tossina tetanica, diluita in acqua o soluzione fisiologica peptonata all'1 %, si comporta come quella diluita in semplice soluzione fisiologica, e ciò anche se il titolo tossico della tossina impiegata è superiore a 1:20.000.

Sul valore di questo limite bisogna, però, intendersi, poichè mentre Condrea e Poenaru non indicano dopo quanti giorni i loro topi morivano, Halter considera come d.l.m. quella che uccide un topo nello spazio di dieci giorni; per cui se si dovesse ragionare nella stessa maniera, il titolo tossico delle tossine da me adoperate è da considerarsi notevolmente superiore, giacchè, come abbiamo visto, 1/10 di d.l.m. per cavia uccideva il topo in 6 giorni.

Con le tre tossine impiegate, dunque, non ci è stato possibile confermare le affermazioni di Condrea e Poenaru e di Halter che il peptone, cioè, faccia aumentare la tossicità della tossina tetanica.

Cadono, di conseguenza, anche tutte le ipotesi emesse dagli Autori per spiegare il fenomeno.

Per quello che riguarda queste ipotesi, voglio soltanto controbattere quella dell'Halter sulle proprietà ossigenofissatrici del peptone, ricordando come l'esperimento mi abbia dimostrato che una tossina tetanica diluita in soluzione fisiologica peptonata si comporta, di fronte alla provocata

ossidazione, in maniera assolutamente identica alla tossina tetanica diluita in soluzione fisiologica.

Sulla ossidazione della tossina tetanica, però, e sulle proprietà della tossina ossidata avrò modo di riferire in altro lavoro.

RIASSUNTO

Contrariamente alle esperienze di Condrea e Poenaru e di Halter, l'Autore rileva come il peptone non esercita alcuna influenza sull'attività della tossina tetanica.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Lab. di Batteriologia. Marzo 1938-XVI.

BIBLIOGRAFIA

(¹) CONDREA P. e POENARU H. - « L'influence des dilutions sur la toxicité de la toxine tétanique » - C. R. Soc. Biol., 122, 1482 (1933).

(²) CONDREA P. e POENARU H. - « Influence de la peptone sur la toxicité de la toxine tétanique » - C. R. Soc. Biol., 112, 1484 (1933).

(³) HALTER K. - « Untersuchungen über die Auswertung und die Wirkungsweise des Tetanustoxine » - Ztschr. f. Hyg. u. Infk., 118, 245 (1933).

