

FLOCCULAZIONE DA TRIPAFLAVINA NEI SIERI NORMALI DI VARIE SPECIE ANIMALI.

Nel compiere alcune ricerche con soluzioni di tripaflavina all'1‰, ebbi occasione di mescolare a parti uguali detta soluzione con un siero normale di cavallo osservando l'immediato intorbidamento del miscuglio seguito da abbondante flocculazione.

Incuriosito dal fenomeno — che mi riusciva nuovo e che mi risultò in seguito mai descritto da altri — volli studiarlo sistematicamente.

Cominciai, così, col ricercare la tecnica migliore per la sua realizzazione.

Sul principio eseguii le mie esperienze con soluzione di tripaflavina (in soluzione fisiologica) all'1‰ saggiando diverse quantità di siero su diverse quantità di soluzione e precisamente:

soluz. di tripaflavina	cc.	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
siero	cc.	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9

constatando come, coll'aumentare del siero, la reazione divenisse meno appariscente o addirittura negativa per la forte diluizione cui andava incontro la tripaflavina, tanto che il miscuglio da giallo prendeva un colorito verde fluorescente.

Contemporaneamente avevo allestito un'altra serie di esperienze con soluzioni di tripaflavina a diverso titolo: 1:2000; 1:3000; 1:4000; 1:5000 e mescolando soluzione e siero a parti uguali. Anche questa volta constatavi come aumentando la diluizione della tripaflavina la flocculazione non si verificasse più.

Per evitare di diluire troppo la tripaflavina adottai allora le seguenti proporzioni: tripaflavina all'1‰ cc. 1, siero cc. 0,5 e, invece di diluire la tripaflavina, diluivi il siero mantenendo, però, sempre costanti le due quantità.

Potei constatare che diluendo il siero (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256) il fenomeno rimaneva d'intensità pressochè identica

sino alla diluizione di 1:4 e poi andava decrescendo sino a divenire pressochè negativo a 1:128.

Ripetei l'esperienza con siero di coniglio constatando come la reazione fosse più intensa che col siero di cavallo.

A questo punto volli vedere se non si potesse migliorare l'intensità della reazione usando una soluzione di tripaflavina più concentrata, usai così tripaflavina sciolta in soluzione fisiologica nella proporzione dell'1%. Perchè la polvere si scioglia totalmente è consigliabile riscaldare su fiamma e poi filtrare per carta allo scopo di trattenere un leggero deposito polverulento che spesso si forma.

Con questa soluzione di tripaflavina all'1% la reazione diviene molto più sensibile tanto che la reazione si ottiene positiva spingendo le diluizioni del siero a titoli molto più elevati.

Dopo vari tentativi, mi sono convinto che il rapporto quantitativo tra siero e tripaflavina era bene fosse di 2:1 e precisamente un centimetro cubo di siero puro o diluito e mezzo centimetro cubo di soluzione di tripaflavina all'1%. E' preferibile versare la tripaflavina nel siero che non il siero nella tripaflavina.

Non si può realizzare una reazione zonale.

Ho voluto anche vedere se la presenza del cloruro di sodio fosse necessaria per avere la flocculazione, e ho visto che il fenomeno si avvera anche adoperando tripaflavina disciolta in acqua distillata, con la sola differenza che, in questo ultimo caso, la reazione è un po' meno sensibile, nel senso che, con siero diluito ad alto titolo, la flocculazione è più appariscente con la tripaflavina disciolta in soluzione fisiologica che non con quella disciolta in acqua distillata.

Per questi motivi ho preferito compiere la ricerche con tripaflavina disciolta in soluzione fisiologica.

Messa così a punto la reazione, ho voluto saggiarla, in questa prima serie di esperienze, sul siero normale di diversi animali, avendo constatato, nelle ricerche di orientamento più sopra citate, esistere una differenza di reazione da parte dei sieri di animali diversi (cavallo e coniglio).

Con tutti i sieri saggiati ho potuto constatare, a seconda della diluizione a cui si adopera il siero, come si possano avere due tipi di reazione: una abbondantissima e tale da rendere il miscuglio addirittura opaco e una in cui si ha una semplice opalescenza. Naturalmente il passaggio da

un tipo all'altro di reazione non è brusco ma graduale, pur essendo abbastanza ben marcata la differenza fra i due tipi di reazione.

Se i tubi in cui si è fatta la reazione si lasciano in riposo per alcune ore, in fondo ad essi si deposita un flocculato che è abbondantissimo nel siero poco diluito e diviene sempre più scarso coll'aumentare della diluizione.

Io ho saggiato la reazione sui sieri normali dei seguenti animali: uomo, cavallo, suino, bue, pecora, coniglio, cavia, ratto, pollo e piccione.

Le diluizioni nel siero sono state per tutti i campioni le seguenti: 1:10, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:450, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:1200, 1:1400, 1:1800, 1:2000 e 1:2400. Per alcuni sieri, di cui si dirà volta per volta, le diluizioni sono state spinte sino a 1:2800, 1:3200, 1:3600, 1:4000, 1:4800, 1:5600 e 1:6400.

I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

Uomo. — Reazione intensissima soltanto alla diluizione di 1:10, intensa sino a 1:100 e via via degradante ma discretamente intensa sino a 1:300. Debole sino a 1:1400; appena visibile sino a 1:3600.

Flocculato abbondante nel primo tubo; discreto sino a 1:300, presente sino a 1:1000, qualche volta sino a 1:1400.

Cavallo. — Reazione intensissima soltanto alla diluizione di 1:10; già meno intensa a 1:50 e sempre più scarsa ulteriormente. La reazione è ben visibile sino alla diluizione di 1:400, appena percettibile sino a 1:800.

Flocculato in generale scarso anche nei primi tubi e presente sino a 1:600.

Maiale. — Reazione intensissima sino alla diluizione di 1:250. In tutti i tubi l'intorbidamento è uguale al primo. Reazione intensa — se pur degradante — sino alle diluizioni di 1:800-1:1000. Reazione visibile sino al titolo di 1:1800, appena percettibile sino a 1:2000.

Flocculato abbondantissimo sino a 1:250, sempre abbondante — se pure in minore quantità — ulteriormente; presente sino a 1:800-1:1000.

Bovino. — Reazione intensissima sino a 1:50; intensa sino a 1:150, diminuisce poi gradatamente, rimanendo ben percettibile sino a 1:700, appena visibile sino a 1:1600.

Flocculato abbondante — ma non quanto quello del maiale — sino a 1:200; diminuisce, poi, notevolmente per trovarsi in tracce sino a 1:1000-1:1200.

Pecora. — Reazione intensissima sino a 1:10; discretamente intensa sino a 1:200; ben visibile sino a 1:800; percettibile sino a 1:3200.

Flocculato scarsissimo, quasi sempre a granuli finissimi che stentano a depositare, presente sino a 1:800.

Coniglio. — Reazione intensissima sino a 1:50; intensa sino a 1:200; ben visibile sino a 1:400; poi l'intorbidamento si fa sempre più tenue per mantenersi, però, presente sino alla diluizione di 1:2400.

La flocculazione è abbondante sino alla diluizione di 1:400. Quando sedimenta dà fiocchi molto grossi. A diluizioni maggiori si ha a volte flocculato scarsissimo quasi polverulento.

Cavia. — Reazione intensissima solo alla diluizione di 1:10; intensa a 1:50, poi va degradando rimanendo discretamente intensa sino a 1:150, ben visibile sino a 1:500, percettibile di solito sino a 1:600-1:700.

Flocculato discreto nei primi tubi e poi scarso o assente.

Ratto. — Reazione intensissima sino a 1:10, intensa a 1:50; discreta sino a 1:150, evidente sino a 1:300, visibile sino a 1:900, qualche volta appena percettibile anche a 1:1400.

Flocculato abbondante nei primi tubi, discreto sino a 1:500; a volte è presente anche a diluizioni maggiori ma scarsissimo.

Pollo. — Reazione intensissima sino a 1:10, intensa sino a 1:150, evidente sino a 1:300, visibile a 1:1200, percettibile qualche volta sino a 1:1600.

Flocculato relativamente discreto nei primi tubi e poi scarso, ma presente talvolta sino a 1:1000.

Piccione. — Reazione molto intensa — ma minore di quella del pollo — a 1:10, poi degrada rapidamente per rimanere visibile sino a 1:600.

Flocculazione scarsa.

Dall'insieme dei fatti osservati si può concludere che i sieri di diverse specie animali danno, con la tripaflavina, reazioni diverse e tipiche per ogni specie.

Se questo è stato l'andamento generale della reazione nei diversi animali, è bene ricordare, ora, come coi sieri delle diverse specie saggiate si abbiano spesso fenomeni paradossi.

Specifico: diluendo, per esempio, un siero da 1:100 e 1:500 — passando di 50 in 50 — l'opacamento va gradatamente diminuendo. Ora accade spesso che con una diluizione intermedia si abbia una reazione del tutto diversa dalla precedente e dalla susseguente, e questa diversità può essere in più o in meno. Per esempio: se col siero al titolo 1:350 e 1:450 si hanno due reazioni che si potrebbero simboleggiare rispettivamente con ++ e con +±, col siero a 1:400 si ha, invece, o opacità e flocculazione maggiore dei due tubi immediatamente antecedente e susseguente (+++) o minore (+).

Per intenderci chiamerò il primo caso *fenomeno paradosso positivo*, il secondo *fenomeno paradosso negativo*.

Col siero di *uomo* ho notato fenomeno paradosso positivo alla diluizione di 1:3200 e negativo al titolo di 1:400.

Col siero di *cavallo*: fenomeno paradosso positivo a 1:800, negativo a 1:300 e 1:400.

Col siero di *maiale*: fenomeno paradosso positivo a 1:250, 1:300, 1:400; negativo a 1:250.

Col siero di *bovino*: fenomeno paradosso positivo a 1:300, 1:500, due volte a 1:1200; negativo a 1:900.

Col siero di *pecora*: fenomeno paradosso positivo a 1:700, tre volte a 1:800, una volta a 1:1300.

Col siero di *coniglio*: fenomeno paradosso positivo a 1:400, 1:800, 1:900, 1:1200, 1:2000; negativo a 1:450 e 1:800.

Col siero di *cavia*: fenomeno paradosso positivo a 1:800; negativo a 1:300.

Col siero di *ratto*: fenomeno paradosso positivo a 1:250, 1:400; negativo a 1:450.

Col siero di *pollo*: fenomeno paradosso positivo a 1:250 e 1:300; negativo a 1:700.

Col siero di *piccione*: non si sono osservati fenomeni paradossi.

Come si vede, i fenomeni paradossi positivi sono molto più frequenti di quelli negativi e si possono avere a tutti i titoli.

Ora che conosciamo il fenomeno, cerchiamo di dare ad esso una interpretazione.

La reazione è, come abbiamo veduto, semplicissima: addizionando a un siero una soluzione di tripaflavina — vale a dire una sostanza colloidale estranea — si ha flocculazione. Questa si deve evidentemente considerare come una manifestazione di labilità colloidale avverantesi al momento dell'unione delle sue sospensioni colloidali: il siero, da una parte, la soluzione di tripaflavina dall'altra.

Questa labilità colloidale è probabilmente dovuta al fatto che le proteine del siero non manifestano sul colloide aggiunto (soluzione di tripaflavina) la stessa azione protettrice, venendosi così a determinare fra di esse un antagonismo che porta alla loro coagulazione e precipitazione (flocculazione).

Naturalmente si deve pensare che questo antagonismo si manifesta fra i due principali componenti del siero: albumina e globulina.

E che così sia, lo è dimostrato soprattutto dal fatto che variando il coefficiente proteico $\frac{\text{albumina}}{\text{globulina}}$ varia anche l'intensità e la sensibilità della reazione.

L'esempio più bello di ciò è dato dal comportamento alla reazione dei sieri di cavallo e di coniglio il cui rispettivo contenuto in globulina, come è noto, è assai diverso tanto che il coefficiente proteico $\frac{\text{albumina}}{\text{globulina}}$ è per il coniglio 2,5, mentre per il cavallo è soltanto 0,58.

Orbene, noi abbiamo veduto come col siero di coniglio si abbia reazione positiva sino al titolo di 1.2400 mentre col siero di cavallo si abbia reazione positiva soltanto sino al titolo di 1:800.

L'intensità della reazione è dunque direttamente proporzionale al coefficiente proteico e inversamente alla quantità di globulina presente nei sieri.

E in ciò la reazione alla tripaflavina differisce dalle altre reazioni proposte per lo studio della labilità serica, in quanto queste reazioni (quelle ai sali di cerio, per esempio) riescono tanto più intense quanto maggiore è il contenuto di globulina presente nel siero in esame; si ha così, a parità di condizioni, maggior flocculazione col siero di cavallo che non col siero di coniglio, l'opposto, cioè, di quanto osservato da me con la reazione alla tripaflavina.

E che non sia la globulina a flocculare nella reazione alla tripaflavina — come invece lo è con le reazioni ai sali di cerio — lo è dimostrato anche dal fatto che liberando un siero dalle globuline — facendo gorgogliare nel siero anidride carbonica sino alla precipitazione delle globuline — il siero così trattato e messo a contatto con una soluzione di tripaflavina seguita a flocculare.

RIASSUNTO

Se a 1 cc. di siero si aggiunge $\frac{1}{2}$ cc. di una soluzione di tripaflavina all'1 % si forma immediatamente un forte intorbidamento seguito da flocculazione. Diluendo il siero, la reazione diventa sempre più debole coll'aumentare del titolo, sino a divenire negativa.

La reazione saggiata sui sieri normali di dieci differenti specie zoologiche (uomo, cavallo, maiale, bovino, pecora, coniglio, cavia, ratto, pollo, piccione) ha dimostrato come sia l'intensità di reazione che il titolo a cui la reazione stessa ancora si compie sono diversi da animale a animale e caratteristici per ogni specie.

La reazione si deve considerare come una manifestazione di labilità colloidale dovuta probabilmente al fatto che le proteine del siero non manifestando sul colorante colloidale aggiunto la stessa azione protettiva, determinano fra esse un antagonismo che porta alla flocculazione.

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

