

40. Calogero GARACI e Vincenzo PIETROGRANDE. — Modificazione
"a freddo,, della reazione di Wassermann.

Riassunto. — Gli AA. descrivono una modificazione della Reazione di Wassermann, in cui l'unione tra antigene ed anticorpo si fa avvenire alla temperatura di ghiacciaia.

Tale modificazione, che con una semplificazione dei metodi originali riunisce i vantaggi della reazione di Jacobsthal e di quella di Hecht, è stata applicata con vantaggio in numerosi casi, ottenendo una bassa percentuale di aspecificità ed un certo numero di reazioni positive, mentre le reazioni Wassermann, parallelamente eseguite, erano negative.

Résumé. — Les AA. décrivent une modification de la réaction de Wassermann, dans laquelle on fait effectuer à la température de glacière l'union entre l'antigène et l'anticorps .

Cette modification, qui réunit, par une simplification des méthodes originales, les avantages de la réaction de Jacobsthal et de celle de Hecht, a été appliquée dans de nombreux cas avec un meilleur résultat, obtenant un bas pourcentage de réactions non spécifiques et un certain nombre de réactions positives alors que les réactions Wassermann parallèlement effectuées étaient négatives.

Summary. — The AA. have described a modification of the Wassermann reaction, in which the union of antigen and antibody is caused to take place at ice-chest temperature.

This modification, which through a simplification of the original methods combines the advantages of both the Jacobsthal and Hecht reactions, has been applied in a number of cases with better results, obtaining a low percentage of non-specific reactions and a certain number of positive reactions, whereas the usual Wassermann reactions carried out at the same time proved negative.

Zusammenfassung. — Die Verfasser beschreiben eine abgeänderte Methode zur Durchführung der Wassermann'schen Reaktion, nach welcher sie die Verbindung von Antigen und Antikörper bei Eisschrank-Temperatur vor sich gehen lassen.

Diese Abänderung, welche durch eine Vereinfachung der ursprünglichen Methoden die Vorteile der beiden Reaktionen von Jacobsthal

and Hecht zusammenfasst, ist in vielen Fällen mit besseren Ergebnissen angewendet worden, indem sich dadurch ein niedriger Prozentsatz von nicht spezifischen Reaktionen erzielen liess und eine gewisse Anzahl von positiven Reaktionen verzeichnet wurde, während die parallel durchgeführten Wassermann'schen Reaktionen negativ waren.

Nella tecnica originale della reazione Wassermann la fissazione del complemento nell'unione tra antigene ed anticorpo avviene ponendo per un'ora le sostanze in termostato a 37° , e questo costituisce il primo tempo della reazione, a cui segue l'aggiunta del complesso emolitico, che rende evidente la fissazione o meno del complemento mediante il fenomeno dell'emolisi.

Numerosi autori, Jacobsthal, Liefmann, Neufeld, Handel, Seligmann, Pinkus, Satta, Donati, ecc. hanno osservato che la fissazione del complemento si produce egualmente, se non meglio, ad una temperatura bassa ($+4^{\circ}$) corrispondente alla temperatura della ghiacciaia.

Jacobsthal ha osservato che, sostituendo al soggiorno a 37° per un'ora il soggiorno in ghiacciaia egualmente per un'ora il numero delle reazioni Wassermann positive aumenta del 2%.

Questo fenomeno, di una migliore fissazione a freddo, sembra essere di ordine generale, e non applicarsi unicamente ai sieri sifilitici. Senza indugiarvi sopra accenniamo ad alcuni di tali casi la cui importanza esula dal campo strettamente biologico per entrare in quello medico, cioè alle cosiddette agglutinine irregolari o «a freddo», M, N e P, presenti nel sangue e che agiscono meglio a temperature da 0° a 20° sia nel sangue della stessa persona che in quello di altri individui anche dello stesso gruppo sanguigno. L'azione del freddo è anche quella che fa produrre nel siero degli emoglobinurici «a frigore» le sostanze capaci di far uscire l'emoglobina non solo dai propri globuli rossi, ma anche da quelli dei soggetti normali. Difatti nella tecnica di Donath e Landsteiner si pongono le emazie emoglobinuriche in ghiacciaia per 10'.

Quale è la ragione della migliore fissazione del complemento a freddo? Viene spontanea l'idea che vi sia differenza del potere anticomplementare che siero ed antigeni possono manifestare col variare delle temperature, ma tali differenze, esaminate da vari autori, sono minime e non

influenzano il risultato definitivo della sieroreazione. Da alcuni Autori è stata fatta l'ipotesi di un intervento delle globuline del siero nello svolgersi della reazione di fissazione tra antigeni e complemento, in quanto che le globuline precipitano generalmente meglio alle basse temperature.

Certamente la modificazione di Jacobsthal eseguita parallelamente alla reazione Wassermann con la tecnica originale, offre dei vantaggi indubitati, essendo positiva, mentre la R. W. rimane debolmente positiva o addirittura negativa, in casi di lue terziaria o curata, ed in qualche caso di lue ereditaria.

Un'altra modificazione della R. W. è quella di Hecht che usa dei sieri freschi attivi, sfruttando perciò il complemento eventualmente presente nel siero umano invece del complemento del siero di cavia. La reazione acquista in specificità. In realtà questo ovvierebbe all'inconveniente dell'inattivazione del siero, che indebolisce in certi casi gli anticorpi sifilitici, modificando le sostanze del siero che sono la causa delle reazioni non specifiche. Sachs ed Altmann hanno difatti dimostrato che il siero luetico attivo può dare una reazione di fissazione del complemento più forte di uno inattivato, anche se ai due sieri, inattivato e no, si aggiunge una egual quantità di complemento. Inoltre nella reazione di Hecht si sfrutta il potere emolitico antimontone, che, in debole quantità, è posseduto da quasi tutti i sieri umani, per cui anzichè aggiungere nel secondo tempo della reazione il sistema emolitico (emazie di montone + siero antimontone), si aggiunge unicamente una sospensione di emazie di montone in dose conveniente.

La reazione di Hecht, data la sua delicatezza, in quanto bisogna adoperare dosi minime di reattivi, è stata variamente modificata da Weimberg, da Rubinstein e dalla Stern, la quale ultima aggiunge nel secondo tempo la miscela emolitica (emazie + emolisina), anzichè la sola sospensione di emazie di montone.

La reazione di Hecht, pur nelle sue modificazioni, non è esente da critiche; difatti ad essa si imputa principalmente la percentuale relativamente alta di reazioni aspecifiche.

Certamente aspecificità e sensibilità sono due doti difficilmente accomunabili in una reazione; anzi generalmente noi osserviamo che quanto più una reazione è sensibile, tanto maggiori sono le probabilità di reazioni non specifiche.

Ma i servizi resi dalla reazione di Hecht nelle sue modificazioni sono numerosi, potendo essa svelare dei casi di sifilidi eriditarie, tardive, curate o latenti, mentre la R. W. è negativa.

Partendo da questi presupposti abbiamo cercato una modificazione di tale reazione che rispondesse ai seguenti requisiti:

forte sensibilità portata dal siero attivo;

sensibilizzazione ottenuta con il soggiorno a bassa temperatura;

semplicità di esecuzione, quale certamente non si ha nella reazione di Hecht originale.

Nella nostra modificazione procediamo nel modo seguente: la reazione si esegue su due sole provette di calibro ristretto, di quelle generalmente usate per sierodiagnosi. La provetta n. 1 serve per controllo.

Nelle due provette si pongono cm^3 0,10 di siero attivo, e poi nella prima si pongono cm^3 0,10 di complemento fresco di cavia diluito 1:10 e cm^3 0,30 di soluzione fisiologica e nella seconda cm^3 0,10 di complemento fresco di cavia, cm^3 0,15 di antigene diluito, e cm^3 0,15 di soluzione fisiologica.

Poi si agitano le provette e si pongono per 50' in ghiacciaia a + 4.

Dopo si pone in ognuna delle due provette cm^3 0,30 della miscela emolitica, composta a parti eguali di siero emolitico antimontone diluito convenientemente secondo il titolo e di sospensione di emazie di montone lavate in soluzione fisiologica 1:20.

La lettura si esegue come per una comune R. W.

Riassumendo si procede come segue:

	I	II
siero attivo	cm^3 0,10	0,15
soluzione fisiologica	» 0,30	0,15
complemento 1:10	» 0,10	0,10
antigene diluito	» —	0,15
porre per 50' in ghiacciaia a + 4		
sospensione di emazie di montone in soluzione fisiologica 1:20	cm^3 0,15	0,15
siero emolitico antimontone diluito secondo il titolo	» 0,15	0,15

Occorre, nell'esecuzione della reazione, avere alcune avvertenze: il siero deve essere fresco, altrimenti perderebbe tutto il suo potere complementare; nella scelta dell'antigene noi usiamo generalmente una miscela di estratto alcoolico di cuore di bue e di un antigene colesterinato pure di cuore di bue; spesso uniamo a questi due antigeni anche l'antigene di Bordet-Roukens.

Diluiamo secondo il titolo ogni antigene separatamente e poi li mescoliamo insieme.

Con questa modificazione si sfruttano i vantaggi della modificazione di Hecht, di quella della Stern e di Jacobstal.

Mediante l'aggiunta di complemento fresco si cerca di ovviare alla mancanza di complemento naturale del siero umano in esame, che potrebbe causare una reazione acomplementare del siero; talora l'aggiunta di cm^3 0,10 di complemento diluito può essere insufficiente e può egualmente verificarsi una reazione acomplementare del siero, svelata però dalla mancata emolisi in ambedue le provette.

L'aggiunta nel secondo tempo della reazione, di siero di antimontone + emazie di montone, anzichè della sola sospensione di emazie di montone, come nella tecnica originale di Hecht, serve ad ovviare ad una mancata reazione in quei casi in cui le emolisine antimontone presenti nel siero umano in quantità assai scarsa, risultassero insufficienti ad effettuare la emolisi.

Inoltre la scarsa diluizione del siero in esame permette che si abbia una altissima concentrazione delle reagine sifilitiche eventualmente presenti, facendo della reazione un vero micrometodo ed avvicinandolo a quelle modificazioni, come il micrometodo di Provera dei cui vantaggi si torna ora a parlare con una certa insistenza.

Uno di noi (Pietrogrande), ha applicato il metodo su alcune centinaia di casi presso il laboratorio di analisi dell'Ospedale di S. Giovanni in Roma, diretto dalla dottoressa C. Bucci; senza voler riportare in extenso tutte le osservazioni, ci limitiamo a riepilogarne i risultati.

Complessivamente sono stati esaminati 312 sieri eseguendo parallelamente la reazione di Wassermann, secondo la tecnica originale su tre antigeni, la reazione di Jacobstal, la reazione di Hecht nella tecnica originale e le reazioni di Citochol, di Kahn e di Meinicke di intorbidamento. Su 56 reazioni positive si è avuta la concordanza completa in 48 casi; in

5 casi la reazione eseguita nella tecnica sopra esposta fu positiva contro una R. W. negativa; in tutti i casi fu però positiva anche la Kahn e la Meinicke e in tre casi anche la Jacobstal; si trattava in tre casi di lue curata, in uno di una sospetta lue in una donna con marito luetico accertato, ed in un caso di un figlio di padre sicuramente luetico. In tre casi la reazione eseguita con il metodo sopra accennato fu positiva, contro la negatività di tutte le altre reazioni sierologiche contemporaneamente allestite; in due casi si trattava di persone con anamnesi e manifestazioni cliniche negative per la sifilide, il terzo caso invece riguardava una persona che molti anni prima aveva avuto una R. W. positiva e che aveva eseguito alcuni cicli di cure antiluetiche regolari.

A corollario di questa breve nota vogliamo però ricordare come tutte le sierodiagnosi, ma specialmente quelle eseguite col metodo della deviazione del complemento, abbiano una certa percentuale di aspecificità; questo fatto non infirma il loro valore diagnostico, ma spinge il laboratorista a controllare con altre reazioni sussidiarie la esattezza della risposta ottenuta. E' con questo concetto che la modificazione oggetto della presente nota è stata applicata; è stata cioè sempre usata in parallelo alle altre sieroreazioni per la lue, e crediamo che essa non possa nè debba sostituirsi ad esse; solo può, se eseguita in parallelo, offrire dei dati utili specialmente nei casi in cui una persistente negatività della R. W. contrasta con anamnesi o quadri clinici che svelano una infezione luetica.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità. 23 febbraio 1948.

(¹) HECHT, Wiener Klin. Woch., 1742 (1908).

(²) HECHT, Zeitsch. f. Immunitätsforsch., 5, 572 (1909).

(³) HECHT, Wiener Klin. Woch., 265 (1909).

(⁴) JACOBSTAHL, Zeitsch. f. Immunitätsforsch., 8 (1910).

(⁵) JACOBSTAHL, Zeitsch. f. Immunitätsforsch., 8, 107 (1911).

(⁶) VIGANÒ, La tecnica sierologica, I.S.M., Milano (1926).

(⁷) P. RONDONI, Biochimica, UTET, Torino (1941).
