

11. Leonida RAVAIOLI. — Frazionamento elettroforetico di sieri immuni. — I.) Variazioni delle frazioni proteiche nei sieri precipitanti le proteine bovine e ovine.

Riassunto. — Il lavoro si prefigge due scopi: valutare per mezzo dell'elettroforesi le variazioni nelle diverse frazioni seriche su sieri di coniglio immunizzati con proteine bovine ed ovine e, previa saturazione di questi sieri immuni, identificare gli anticorpi precipitanti specifici ed aspecifici. Le conclusioni a cui si è giunti sono che:

— l'immunizzazione anti proteine bovine e ovine provoca nei sieri di coniglio, un graduale aumento percentuale delle γ globuline;

— la media dei quozienti altezza/base dell'onda γ aumenta nei sieri degli animali dopo il trattamento immunizzante e questo può fare ritenere che tale trattamento oltre a determinare un aumento delle γ globuline, indirizzi la produzione degli anticorpi verso le γ globuline stesse rendendole più omogenee all'indagine elettrochimica;

— l'analisi elettroforetica eseguita su sieri immuni prima e dopo saturazione, permette di valutare la quantità percentuale delle precipitine aspecifiche e specifiche.

Résumé. — Cette recherche se propose deux buts: évaluer au moyen de l'électrophorèse les variations dans les différentes fractions du sérum de lapins immunisés avec des protéines bovines et ovines et, moyennant la saturation de ces sérums immunisés, identifier les anticorps spécifiques qui précipitent.

Les conclusions auxquelles on est arrivé sont les suivantes:

— l'immunisation anti protéines bovines et ovines cause dans les sérums de lapin une progressive augmentation du pourcentage des γ globulines;

— la moyenne des quotient hauteur/base de l'onde γ augmente dans les sérums des animaux après le traitement immunisant et ceci peut suggérer que ce traitement ne détermine pas seulement une augmentation des γ globulines, mais dirige la production des anticorps vers les γ globulines elles-mêmes en les rendant plus homogènes pour la recherche électrochimique;

— l'analyse à l'électrophorèse faite sur des sérums immunisés avant et après leur saturation, permet d'apprécier le pourcentage des précipitines non spécifiques et spécifiques.

Summary. — The investigation had two aims: to evaluate by means of electrophoresis the variations in different serum fractions of rabbit sera immunized with bovine and ovine proteins; and, after saturation of these immune sera, to identify the specific and aspecific precipitating antibodies. The conclusions reached are that:

1) anti-bovine and ovine protein immunization causes, in rabbit sera, a gradual percentage increase of γ globulin;

2) the average height to base quotient of the γ wave increases in animal sera after immunizing treatment, which reminds us that this treatment, apart from inducing an increase of γ globulin, induces production of antibodies most specifically towards γ globulins themselves, making them more homogeneous on electro-chemical investigation;

3) electrophoretic analysis carried out on immune sera before and after saturation makes it possible to evaluate the percentage quantity of the aspecific and specific precipitins.

Zusammenfassung. — Die Arbeit hat einen doppelten Zweck. Einmal sollen mittels Elektrophorese die Veränderungen der verschiedenen Serumfraktionen bei Seren von mit Rind- und Schafproteinen immunisierten Kaninchen; ferner sollen nach vorhergehender Sättigung dieser immunen Seren die spezifischen und aspezifischen Gegenkörper festgestellt werden, die einen Niederschlag bilden. Hierbei kam man zu folgenden Schlussfolgerungen:

Die Immunisierung mit Rind- und Schafproteinen verursacht in den Seren von Kaninchen eine gradweise Erhöhung des Prozentsatzes der γ -Globuline.

Der Durchschnitt der Quotienten Höhe/Basis der γ -Welle erhöht sich bei den Seren der Tiere nach der Immunisierungsbehandlung, woraus zu schliessen ist, dass diese Behandlung eine Vermehrung der γ -Globuline zur Folge hat und ausserdem die Produktion der Gegenkörper den γ -Globulinen zulenkt, die hierdurch bei der elektrochemischen Untersuchung mehr homogen werden.

Die bei immunen Seren vor und nach der Sättigung durchgeführte elektrophoretische Analyse gestattet den Prozentsatz der aspezifischen und spezifischen Präzipitinen zu werten.

Nella preparazione, dal coniglio, di sieri precipitanti ad alto titolo le proteine animali di una specie zoologica, MAZZARACCHIO (¹) aveva notato come all'attività precipitante specifica si accompagnasse un limitato po-

tere precipitante aspecifico verso proteine di altri animali appartenenti a gruppi zoologici affini. Per es. un siero precipitante antiuomo possiede sempre un notevole potere precipitante verso le proteine di scimmia (*Macacus rhesus*) ⁽²⁾, un siero anticavallo verso la proteina di asino e di mulo, un siero antibue verso la proteina di pecora, un siero antipollo verso la proteina di piccione e viceversa.

Tali precipitine aspecifiche sono state chiamate [WOLFE ⁽³⁾] « precipitine di gruppo », allorchè reagiscono con proteine di animali appartenenti a gruppi zoologici affini, « precipitine di extra gruppo », allorchè reagiscono con proteine di animali zoologicamente lontani.

Con la saturazione è possibile eliminare sia le precipitine aspecifiche di gruppo che quelle di extra gruppo; tale procedimento però determina una notevole diminuzione delle precipitine specifiche. In ogni modo queste tecniche di saturazione, oltre ad avere una finalità pratica di evidente valore, permettendo esse la preparazione di sieri precipitanti privi di qualsiasi aspecificità, ci danno la possibilità di avvicinare sierologicamente gruppi zoologici più o meno lontani.

In considerazione del fatto che gli anticorpi sono intimamente legati ad alcune frazioni seriche o sono essi stessi particolari frazioni seriche modificate, in considerazione anche del fatto che il frazionamento elettroforetico del siero permette di valutare quantitativamente le variazioni nei rapporti albumina-globulina e delle globuline tra loro, ho voluto utilizzare tale mezzo per cercare di chiarire il fenomeno sopra accennato.

Lo scopo del lavoro è stato duplice. In una prima esperienza si sono determinate, per mezzo dell'elettroforesi, le variazioni dei diversi elementi serici di un gruppo di conigli nel corso dell'immunizzazione verso proteine bovine e di un gruppo di conigli nel corso dell'immunizzazione verso proteine ovine. Nella seconda esperienza si sono determinate, per mezzo dell'elettroforesi, le variazioni dei diversi elementi serici dei sieri immuni antibovino e dei sieri immuni antiovino dopo saturazione.

TECNICHE SEGUITE.

Per la preparazione dei sieri immuni ho proceduto nel seguente modo: due gruppi di conigli di sei animali ciascuno del peso di g 2000-2500 sono stati rispettivamente trattati per via endovenosa con siero normale bovino e siero normale ovino. Sono state eseguite quattro inoculazioni: tre da cm³ 1 ed una da cm³ 2 alla distanza, l'una dall'altra, di cinque giorni. 24 ore prima di ogni inoculazione veniva prelevato un campione di sangue dal cuore. Otto giorni dopo l'ultima inoculazione è

stato eseguito il salasso in bianco. Su ogni campione di siero sono state fatte le seguenti ricerche: proteina totale, frazionamento elettroforetico, attività precipitante specifica ed aspecifica.

Proteina totale. — Per tale determinazione si è usato il reattivo di Nessler e la tecnica descritta da KING ⁽⁴⁾. La lettura è stata eseguita ad uno spettrofotometro « Unican » con λ 500.

Elettroforesi. — Il frazionamento elettroforetico e la determinazione quantitativa delle frazioni mediante misura densimetrica diretta sono state eseguite secondo la tecnica di GRASMANN e HANNING ⁽⁵⁾ con un apparecchio « Label ».

Si è usata carta Whatman n. 1 in strisce di cm 30 × 4; soluzione tampone al Veronal acetato e ossalato con pH 8,6 e forza ionica μ 0,1; tensione di 4,73 V/cm per la durata di 11 h. Il colorante usato è stato l'amidoschwarz 10 b Bayer, e la decolorazione è stata eseguita secondo ANTONINI e PIVA ⁽⁶⁾ con alcool metilico al 50% e acido acetico al 10%. Le determinazioni percentuali sono state calcolate su diagrammi fortemente ingranditi misurando per via planimetrica.

Sieroprecipitazione. — Questa reazione è stata eseguita stratificando il siero in esame sotto l'antigene serialmente diluito.

La saturazione dei sieri precipitanti, prima con antigene eterologo (saturazione delle precipitine aspecifiche di gruppo) e poi con antigene omologo (saturazione delle precipitine specifiche), aveva lo scopo di eliminare totalmente dal siero in esame gli anticorpi precipitanti sia specifici che aspecifici. In tale maniera era possibile controllare quantitativamente, con la elettroforesi, le variazioni delle diverse frazioni seriche.

Al fine di evitare che un eccesso anche minimo del siero saturante potesse alterare quantitativamente le frazioni seriche del siero saturato, era necessario trovare per ogni siero il punto limite in cui tutti gli anticorpi, legandosi con i rispettivi antigeni, si annullassero a vicenda. A tale scopo il siero saturante veniva addizionato al siero in esame nella proporzione di 1:10 o di 1:20 a seconda dei casi, tenuto 12 h a 4°C e quindi centrifugato. Il supernatante veniva diviso in due parti uguali e mentre una era conservata in frigorifero l'altra veniva di nuovo sottoposta al trattamento sopradetto. Il procedimento si ripeteva sino a non aversi più precipitazione. L'ultima porzione di siero che dava ancora precipitazione veniva considerata il punto limite e adoperata per le ulteriori ricerche.

RISULTATI.

Dalla prima esperienza si è potuto dedurre quanto segue.

La percentuale delle proteine totali ha presentato sbalzi piuttosto elevati non solo da animale ad animale ma anche nel singolo animale durante il corso dell'esperienza. I valori ottenuti sono stati, in linea di massima, più alti di quelli riportati da altri Autori [JANSSEN e coll. ⁽⁷⁾, ANTONINI e PIVA ⁽⁸⁾].

Il frazionamento elettroforetico su siero di conigli sottoposti a trattamento immunizzante è già stato eseguito da vari AA. [JANSSEN e coll. ⁽⁷⁾, HASSIG e WUNDERLY ⁽⁹⁾, HORRENBERGER e ROUBERT ⁽¹⁰⁾].

I dati conseguiti in questa esperienza concordano con quelli degli AA. che mi hanno preceduto. Man mano che l'immunizzazione procede si ha un costante progressivo aumento delle globuline, specie delle γ , a detrimento dell'albumina. Nell'unico caso in cui tale regola non è rispettata (tabella n. 1, coniglio n. 3) il titolo precipitante è notevolmente basso. Si ha quindi, per questo caso, una duplice conferma della mancata reattività dell'organismo allo stimolo antigene.

A carico delle globuline α , e cioè α_1 , + α_2 , e β , salvo un lieve aumento generalmente iniziale, non si è notato nulla di particolare.

L'attività precipitante sia specifica che aspecifica è comparsa in ritardo rispetto all'aumento delle globuline. Mentre infatti queste ultime sono aumentate subito, cioè dopo quattro giorni dalla prima inoculazione di antigene, le precipitine si sono rivelate solo dopo la seconda introduzione di antigene, cioè al 9° giorno.

Le tabelle n. 1 e 2 riportano i risultati di questa prima esperienza.

WUHRMANN, WUNDERLY e DE NICOLA ⁽¹¹⁾ ritengono che la diversa forma della curva elettroforetica possa venire ricondotta ad una eventuale maggiore o minore omogeneità della sostanza proteica in esame. Essi, in alcuni studi sulle iperglobulinemie γ , hanno preso in considerazione il rapporto numerico esistente tra l'altezza e la base dell'onda γ . Per questi AA. « se una proteina è omogenea dal punto di vista delle sue proprietà elettrochimiche, essa fornisce nel tracciato elettroforetico una curva alta e assottigliata, mentre se è eterogenea, la curva si distribuisce su di una superficie più ampia ». Quando il quoziente altezza base dell'onda elettroforetica è grande (onda alta ed appuntita) ci si trova di fronte a una frazione serica assai omogenea, mentre con quoziente piccolo (onda bassa e larga) la frazione serica sarà formata da proteine eterogenee. Partendo da questo presupposto si è voluto vedere se il quoziente altezza/base dell'onda γ variasse sensibilmente nei sieri dei coni-

gli dopo trattamento immunizzante. La media dei quozienti altezza/base dell'onda γ nei conigli prima dell'immunizzazione con siero bovino è stata di 0,45 mentre alla fine del trattamento è salita a 0,99. Meno forte, ma pur sempre evidente, è stato l'aumento del quoziente nei sieri dei conigli trattati con siero ovino. Esso è partito da 0,50 prima del trattamento ed è giunto a 0,68 dopo l'immunizzazione.

Per accertare statisticamente quale fiducia potesse essere accordata a questi risultati si sono confrontati i valori delle due medie calcolandone il « t » secondo STUDENT ⁽¹²⁾. La formula usata, essendo le osservazioni inferiori a 30 è stata:

$$t = \frac{\bar{x}^1 - \bar{x}^2}{S \sqrt{1/N_1 + 1/N_2}}$$

In tal modo per le due prime medie a confronto (0,45 e 0,99) si è ottenuto un $t = 3,69$ pari a $P < 0,01$; per le due seconde medie (0,50 e 0,68) si è ottenuto un $t = 3,27$ pari a $P < 0,01$.

Questo indica che la differenza osservata tra le due medie ha meno di una probabilità su cento di essere dovuta al caso. La differenza tra i valori medi, nei due casi, è quindi da considerarsi attendibile.

Ciò sta ad indicare che il trattamento immunizzante, oltre a determinare un aumento delle γ globuline, indirizza la produzione degli anticorpi verso le γ globuline stesse rendendole più omogenee all'indagine elettrochimica.

Dalla seconda esperienza si è potuto dedurre quanto segue.

La saturazione, con la tecnica precedentemente descritta, dei sieri precipitanti bovini con siero normale ovino (tabella n. 3) ha fatto totalmente scomparire l'attività precipitante aspecifica e notevolmente diminuire quella precipitante specifica.

Con il frazionamento elettroforetico, successivo alle prove di saturazione, si è notato un aumento nella percentuale della albumina con corrispondente diminuzione della percentuale delle globuline, specie delle γ .

La successiva saturazione con siero bovino (tabella n. 4) ha fatto totalmente scomparire qualsiasi attività precipitante ed ha ancor più accentuato l'aumento delle albumine a discapito delle globuline.

Lo stesso fenomeno si è verificato con i sieri precipitanti ovini (tabella n. 5 e n. 6).

Frazionamento elettroforetico di sieri di conigli in

Prelievi	Coniglio N. 1							Prot. totale g %	Alb. %
	Prot. totale g %	Alb. %	Globuline %			Titolo precip. specifico (bovino)	Titolo precip. aspecifico (ovino)		
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ				
Inizio esperimento	7,78	64,41	5,61	14,04	15,91	— 1:10	— 1:10	7,73	75,3
Dopo I inocul.	7,50	63,95	9,43	11,71	14,88	— 1:10	— 1:10	7,87	66,7
Dopo II inocul.	8,65	59,23	11,54	12,86	16,32	+ 1:2000	+ 1:10	8,12	61,3
Dopo III inocul.	8,25	50,63	11,28	15,04	23,03	+ 1:4000	+ 1:500	8,62	57,6
Dopo IV inocul.	7,75	52,96	12,11	10,92	23,99	+ 1:9000	+ 1:4000	8,34	55,9

Prelievi	Coniglio N. 4							Prot. totale g %	Alb. %
	Prot. totale g %	Alb. %	Globuline %			Titolo precip. specifico (bovino)	Titolo precip. aspecifico (ovino)		
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ				
Inizio esperimento	7,28	59,14	12,13	12,92	17,79	— 1:10	— 1:10	7,93	64,91
Dopo I inocul.	7,75	65,11	7,55	8,65	18,67	— 1:10	— 1:10	7,06	59,51
Dopo II inocul.	8,12	70,39	7,61	10,01	11,97	+ 1:100	+ 1:10	7,93	60,84
Dopo III inocul.	8,00	55,64	9,83	11,42	23,09	+ 1:1000	+ 1:50	7,50	58,92
Dopo IV inocul.	7,28	55,55	10,15	10,47	23,80	+ 1:8000	+ 1:4000	7,25	61,08

TABELLA N. 1

corso di immunizzazione anti proteine bovine

Coniglio N. 2					Coniglio N. 3						
Globuline ‰			Titolo precip. specifico (bovino)	Titolo precip. aspecifico (ovino)	Prot. totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. specifico (bovino)	Titolo precip. aspecifico (ovino)
$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ					$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
8,12	6,58	9,92	— 1:10	— 1:10	7,07	63,15	13,15	10,52	13,15	— 1:10	— 1:10
9,83	10,26	13,17	— 1:10	— 1:10	7,12	68,54	11,61	10,90	8,93	— 1:10	— 1:10
12,53	10,40	15,67	+ 1 50	+ 1:10	7,62	68,90	11,23	9,58	10,27	+ 1:10	— 1:10
12,13	10,74	19,41	+ 1:1000	+ 1:10	7,25	54,15	14,73	18,33	12,77	+ 1:100	± 1:50
13,79	9,42	20,84	+ 1:8000	+ 1:4000	7,31	64,32	13,69	10,88	11,10	± 1 500	± 1:100

Coniglio N. 5					Coniglio N. 6						
Globuline ‰			Titolo precip. specifico (bovino)	Titolo precip. aspecifico (ovino)	Prot. totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. specifico (bovino)	Titolo precip. aspecifico (ovino)
$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ					$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
14,86	10,62	9,60	— 1:10	— 1:10	7,75	65,96	11,51	12,04	10,47	— 1:10	— 1:10
14,56	10,27	15,63	— 1:10	— 1:10	7,62	60,00	11,70	13,65	14,63	— 1:10	— 1:10
11,81	12,34	14,99	+ 1:10	— 1:10	7,50	60,46	11,59	12,72	15,20	+ 1:500	+ 1:10
11,61	11,61	17,84	+ 1:100	+ 1:10	8,25	47,18	15,18	15,93	21,69	+ 1:4000	± 1:1000
12,75	9,05	17,09	± 1:1000	± 1:500	8,65	45,73	15,10	13,85	25,30	+ 1:9000	± 1 5000

Frazionamento elettroforetico di sieri di conigli in

Prelievi	Coniglio N. 7							Prot. totale g ‰	Alb. ‰
	Prot. totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. specifico (ovino)	Titolo precip. aspecifico (bovino)		
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ				
Inizio esperimento	7,96	62,59	13,38	13,72	10,29	— 1:10	— 1:10	7,78	68,50
Dopo I inocul.	7,09	51,66	13,87	18,08	16,38	— 1:10	— 1:10	8,87	65,30
Dopo II inocul.	7,87	58,10	13,26	14,74	13,87	+ 1.500	+ 1.50	7,87	61,70
Dopo III inocul.	8,28	51,34	14,66	15,89	18,09	+ 1.4000	+ 1.500	7,65	60,30
Dopo IV inocul.	8,84	45,90	10,65	16,36	27,04	+ 1.13000	+ 1.2000	8,49	59,80

Prelevi	Coniglio N. 10							Prot. totale g %	Alb. %
	Prot. totale g %	Alb. %	Globuline %			Titolo precip. specifico (ovino)	Titolo precip. specifico (bovino)		
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ				
Inizio esperimento	7,78	66,69	12,75	9,92	10,63	— 1:10	— 1:10	8,12	69,17
Dopo I inocul.	8,84	65,24	13,70	10,08	10,96	— 1:10	— 1:10	8,71	62,28
Dopo II inocul.	8,91	56,47	15,61	12,95	14,95	+ 1 500	+ 1.50	8,68	52,88
Dopo III inocul.	8,68	49,39	15,11	17,03	18,45	+ 1 3000	+ 1 500	(deceduto)	
Dopo IV inocul.	8,15	48,54	14,38	15,44	21,62	+ 1.7000	+ 1:1000		

TABELLA N. 2

corso di immunizzazione anti proteine ovine

Coniglio N. 8					Coniglio N. 9						
Globuline %			Titolo precip. specifico (ovino)	Titolo precip. aspecifico (bovino)	Prot. totale g %	Alb. %	Globuline %			Titolo precip. specifico (ovino)	Titolo precip. aspecifico (bovino)
$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ					$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
10,27	12,28	8,93	— 1:10	— 1:10	8,81	58,75	8,90	17,80	14,54	— 1:10	— 1:10
11,57	12,92	10,12	— 1:10	— 1:10	8,84	57,58	16,08	13,81	12,50	— 1:10	— 1:10
13,74	13,26	11,21	+ 1:500	— 1:10	8,90	55,76	15,20	15,20	13,82	+ 1:50	— 1:10
12,75	12,16	14,74	+ 1:3000	+ 1:50	8,87	55,65	14,20	12,49	17,64	+ 1:3000	+ 1:10
10,69	12,85	16,60	+ 1:15000	+ 1:2000	7,49	58,04	11,88	13,98	16,08	+ 1:7000	+ 1:500

Coniglio N. 11					Coniglio N. 12						
Globuline %			Titolo precip. specifico (ovino)	Titolo precip. aspecifico (bovino)	Prot. totale g %	Alb. %	Globuline %			Titolo precip. specifico (ovino)	Titolo precip. aspecifico (bovino)
$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ					$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
11,35	8,55	10,91	— 1:10	— 1:10	7,77	60,68	11,38	18,35	9,58	— 1:10	— 1:10
15,46	12,75	9,49	— 1:10	— 1:10	7,93	56,66	16,24	16,30	10,78	— 1:10	— 1:10
16,82	17,30	12,98	+ 1:500	+ 1:10	8,81	67,88	12,60	10,16	9,34	+ 1:1000	+ 1:50
per shoch alla III inoculazione)					8,12	51,63	15,86	15,86	16,63	+ 1:3000	+ 1:500
					8,75	43,71	14,37	18,79	23,11	+ 1:10000	+ 1:2000

TABELLA N. 3

Sieri precipitanti anti bovino dopo saturazione con siero normale ovino

Coniglio	Proteina totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. aspecifico (ovino)	Titolo precip. specifico (bovino)
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
N. 1	7,90	58,96	7,99	11,13	21,91	— 1 : 10	+ 1 : 4.000
N. 2	7,50	59,73	10,64	8,46	21,14	— 1 : 10	+ 1 : 4.000
N. 3	7,50	60,46	11,89	10,51	17,12	— 1 : 10	+ 1 : 100
N. 4	7,78	56,00	10,16	10,74	23,08	— 1 : 10	+ 1 : 2.000
N. 5	7,50	58,06	12,90	10,75	18,27	— 1 : 10	$\pm$ 1 : 100
N. 6	8,39	51,34	12,53	14,01	22,10	— 1 : 10	+ 1 : 4.000

TABELLA N. 4

Sieri precipitanti anti bovino dopo saturazione con siero normale ovino e con siero normale bovino

Coniglio	Proteina totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. aspecifico (ovino)	Titolo precip. specifico (bovino)
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
N. 1	8,90	59,24	8,68	11,53	20,53	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 2	8,49	60,86	9,43	8,88	20,81	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 3	8,65	65,65	10,28	9,18	14,87	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 4	8,87	60,28	9,74	10,10	19,85	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 5	8,99	66,81	10,23	9,15	13,79	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 6	8,77	54,08	9,86	14,62	21,42	— 1 : 10	— 1 : 10

TABELLA N. 5

Sieri precipitanti anti ovino dopo saturazione con siero normale bovino

Coniglio	Proteina totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. aspecifico (bovino)	Titolo precip. specifico (ovino)
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
N. 7	8,93	48,17	9,83	15,02	26,96	— 1 : 10	+ 1 : 10.000
N. 8	7,49	64,57	7,67	10,48	17,26	— 1 : 10	+ 1 : 7.000
N. 9	8,06	56,70	7,83	14,84	20,61	— 1 : 10	+ 1 : 7.000
N. 10	8,93	50,62	9,92	15,38	24,06	— 1 : 10	+ 1 : 2.000
N. 12	9,00	50,22	6,25	19,41	24,10	— 1 : 10	+ 1 : 7.000

TABELLA N. 6

Sieri precipitanti anti ovino dopo saturazione con siero normale bovino e con siero normale ovino

Coniglio	Proteina totale g ‰	Alb. ‰	Globuline ‰			Titolo precip. aspecifico (bovino)	Titolo precip. specifico (ovino)
			$\alpha_1 + \alpha_2$	β	γ		
N. 7	8,40	54,64	9,91	16,95	18,48	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 8	8,93	57,03	8,35	12,29	22,32	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 9	8,12	56,94	10,54	13,18	19,33	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 10	8,49	56,10	9,26	15,83	18,79	— 1 : 10	— 1 : 10
N. 12	8,49	50,65	9,11	20,26	19,95	— 1 : 10	— 1 : 10

Nelle tabelle n. 7 e 8 sono raggruppati i valori percentuali delle albumine e di tutte le frazioni globuliniche alla fine del trattamento immunizzante, dopo saturazione con siero eterologo (eliminazione delle precipitine aspecifiche di gruppo) e dopo saturazione con siero omologo (eliminazione delle precipitine specifiche). Se prendiamo come esempio il siero di coniglio n. 7 (tabella n. 8) possiamo constatare come alla fine della immunizzazione con siero ovino la percentuale dell'albumina sia del 45,90% e quella delle globuline in toto del 54,05%. Dopo saturazione con siero eterologo, (siero bovino) si ha una diminuzione della percentuale delle globuline corrispondente al 2,24% (54,05-51,81), percentuale che sta ad indicare la quantità di anticorpi aspecifici di gruppo. La successiva saturazione con siero omologo (siero ovino) ha fatto nuovamente diminuire la percentuale delle globuline del 6,47% (51,81-

TABELLA N. 7

TABELLA N. 8

Tabelle riassuntive dei valori percentuali dell'albumina e delle globuline alla fine dell'immunizzazione, dopo saturazione delle precipitine aspecifiche e dopo saturazione delle precipitine specifiche

Coni- glio N.	Sieri immuni anti- bovino saturati con siero normale:	Alb. %	Glob. %	Coni- glio N.	Sieri immuni anti ovino saturati con siero normale:	Alb. %	Glob. %
1	—	52,96	47,02	7	—	45,90	54,05
1	Ovino	58,96	41,03	7	Bovino	48,17	51,81
1	Bovino	59,24	40,74	7	Ovino	54,64	45,34
2	—	55,93	44,05	8	—	59,84	40,14
2	Ovino	59,73	40,24	8	Bovino	64,57	35,41
2	Bovino	60,86	39,12	8	Ovino	57,03	42,96
3	—	64,32	35,67	9	—	58,04	41,94
3	Ovino	60,46	39,52	9	Bovino	56,70	43,28
3	Bovino	65,65	34,33	9	Ovino	56,94	43,05
4	—	55,55	44,42	10	—	48,54	51,44
4	Ovino	56,00	43,98	10	Bovino	50,62	49,36
4	Bovino	60,28	39,69	10	Ovino	56,10	43,88
5	—	61,09	38,89	12	—	43,71	56,27
5	Ovino	58,06	41,92	12	Bovino	50,22	49,76
5	Bovino	66,81	33,17	12	Ovino	50,65	49,32
6	—	45,73	54,25				
6	Ovino	51,34	48,64				
6	Bovino	54,08	45,90				

43,34). Questa percentuale ci indica la quantità di anticorpi specifici del siero in esame. Nel frattempo le percentuali dell'albumina sono andate via via crescendo dal 43,90% al 48,17% fino al 54,64%. Il fenomeno si spiega abbastanza chiaramente tenendo presente che la saturazione è stata eseguita con siero in toto; in tal modo, mentre tra le frazioni globuliniche è avvenuta una reazione specifica che ne ha legato e sottratto una parte, facendole precipitare, le frazioni albuminiche si sono semplicemente addizionate. L'interpretazione del fenomeno in questo senso viene convalidata anche da risultati (quali quelli della tabella n. 7, coniglio n. 3 e 5) che apparentemente potevano contraddirla. Se infatti consideriamo il titolo precipitante massimo di aspecificità dei due sieri sopra menzionati, ci si accorge che esso è notevolmente basso. E' quindi assai probabile che in questi casi la quantità di siero saturante eterologo sia stato aggiunto in eccesso e le sue frazioni globuliniche non si siano vicendevolmente neutralizzate. In altre parole le frazioni globuliniche invece di legarsi, precipitando, si sono addizionate. A parziale convalida di ciò la saturazione con siero omologo (siero bovino) ha considerevolmente abbassato la percentuale delle globuline soprattutto se si tiene conto, nel siero n. 3, di un aumento del 3,85% di globuline (39,52-35,67) dovute alla mancata saturazione con siero eterologo. Lo stesso dicasi del siero n. 5. Una interpretazione pressochè analoga può essere chiamata in causa per spiegare il comportamento dei sieri n. 8 e 9 (tabella n. 8).

CONCLUSIONI

Dalle esperienze eseguite e dalla interpretazione che di esse si è potuto dare è possibile concludere che:

1) l'immunizzazione anti proteine bovine ed ovine provoca, nei sieri di coniglio, un aumento percentuale delle γ globuline;

2) la media dei quozienti altezza/base dell'onda γ aumenta nei sieri degli animali dopo il trattamento immunizzante (questo può fare ritenere che il trattamento immunizzante oltre a determinare un aumento delle γ globuline indirizzi la produzione degli anticorpi verso le γ globuline stesse rendendole più omogenee all'indagine elettrochimica);

3) l'analisi elettroforetica eseguita su sieri immuni prima e dopo saturazione, permette di valutare la quantità percentuale delle precipitine aspecifiche e specifiche.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MAZZARACCHIO V. - Nota I - Rend. Ist. Sup. Sanit, 16: 340 (1938).
 - (²) MAZZARACCHIO V. - Nota III - Rend. Ist. Sup. Sanità, 16: 639 (1938).
 - (³) WOLFE H. R. - The Journ. of Imm., 29: 1 (1935).
 - (⁴) KING - Micro-Analysis in Medical Biochemistry, pag. 34, London (1947).
 - (⁵) GRASSMANN W. e HANNING K. - Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem., 290: 1 (1952).
 - (⁶) ANTONINI P. M. e PIVA C. - Rec. Prog. in Medic., 44: 243 (1953).
 - (⁷) JANSSEN L. W. e coll. - Electrophoretic studies on serum proteins. - Pag. 29, Amsterdam (1951).
 - (⁸) ANTONINI F. M. e PIVA C. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 28: 1887 (1952).
 - (⁹) HASSIG A. e WUNDERLY C. H. - Boll. Ist. Sierot. Mil., 32: 60 (1953).
 - (¹⁰) HORRENBERGER R. e ROUBERT L. - Arch. de l'Inst. Pasteur d'Algérie, 28: 350 (1950).
 - (¹¹) WUHRMANN F., WUNDERLY Ch., DE NICOLA P. - Rec. Progr. in Med., 8: 295 (1950).
 - (¹²) BARBENSI G. - Introduzione alla Biometria, pag. 125, Firenze (1952).
-