

21. A. AUREGGI, A. MOSCA, R. PARIENTE, L. RAVAIOLI. — **L'emoagglutinazione con emazie tannizzate nella ricerca degli anticorpi anti-omoinnesto**

Riassunto. — Su due pazienti volontari, portatori di ulcere post-flebitiche agli arti inferiori, venivano praticati degli omoinnesti dermo-epidermici della grandezza di cm 4×6 circa. All'atto del prelievo dei lembi cutanei si aveva cura di ricavarne un tratto in eccedenza necessario per l'allestimento dell'antigene. I due soggetti venivano poi sottoposti a prelievi frazionati di sangue rispettivamente prima dell'intervento ed il II, III, XII, XV e XXI giornata del decorso postoperatorio. Nel siero così ricavato venivano ricercati gli eventuali anticorpi responsabili della lisi degli innesti omoplastici mediante le seguenti tecniche: emoagglutinazione con emazie tannizzate, siero precipitazione in provetta, precipitazione in agar.

La prima di queste metodiche (emoagglutinazione con emazie tannizzate) si rivelava idonea ai nostri scopi dando delle positività con titoli alquanto elevati. Il movimento anticorpale, pressochè nullo nei primi giorni dell'innesto, andava poi aumentando fino a dare positività massime di 1:160 nel siero prelevato in XXII giornata del decorso postoperatorio.

L'andamento delle prove di laboratorio confortava l'osservazione clinica della lisi dei trapianti in un periodo compreso fra la XII e la XX giornata.

Le tecniche della siero precipitazione in provetta e della siero precipitazione in agar davano risultati costantemente negativi come del resto prevedibile trattandosi di antigeni ed antisieri appartenenti alla stessa specie zoologica (uomo).

Summary. — Two voluntary patients suffering from post-phlebitic ulcers of the lower limbs were subjected to dermo-epidermal homografts of about 4×6 cm. in size. When the graft was taken sufficient excess was reserved for use in detecting antigens. Blood samples were drawn from the two subjects before the operation and 2, 3, 12, 15 and 21 days afterwards. This serum was examined for the presence of antibodies, responsible for the lysis of the homoplastic grafts, by haemoagglutination with tanned erythrocytes, serum precipitations in test tubes and precipitations in agar.

Haemagglutination with tanned erythrocytes proved to be ideal for the purpose, giving positive reactions at fairly high titres. The concentration of antibodies was almost zero in the first days after grafting but

then rose to a maximum positivity of 1/160 in serum drawn on the 21 st day after the operation. The laboratory finding confirms the clinical observation of lysis of the transplant in the period of the 12 th to the 20 th day.

The serum precipitation in test tubes and in agar gave negative results throughout, as would be expected with antigens and antisera from the same zoological species (man.).

Sebbene il problema riguardante l'allestimento delle « banche di tessuti » destinati all'innesto omoplastico abbia attratto, forse più di ogni altro, l'attenzione dei chirurghi e degli sperimentatori tuttavia non si è ancora addivenuti ad una metodica capace di rendere costantemente possibile il trasferimento di un tessuto o di un organo da un essere umano ad un altro.

La impossibilità del trapianto omoplastico nell'uomo dipenderebbe, con ogni verosimiglianza, dalla presenza nel tessuto del donatore di antigeni governati da molteplici fattori tutti legati alla individualità genetica del soggetto. Tali antigeni, portati a contatto dell'organismo ospite, reagirebbero con gli anticorpi formati dal ricevente rendendosi così responsabili della morte e della eliminazione dell'innesto omoplastico. I principali dati clinici e sperimentali portati a sostegno di questa teoria della immunità acquisita sono:

1) l'osservazione del periodo di latenza necessario alla vascolarizzazione dell'innesto omologo (24-48 ore) [TAYLOR A. C. e LEHRFELD J. W. ⁽¹⁾] e alla consecutiva formazione degli anticorpi da parte dell'ospite. In una fase iniziale infatti, non più lunga di 7-8 giorni, l'omoinnesto appare in condizioni di vitalità e di adattamento così soddisfacenti da non potersi distinguere dagli innesti autologhi. Successivamente la reazione antigene-anticorpo porterà alla sua definitiva eliminazione [MEDAWAR P. B. ^(2, 3); SCOTHORNE R. J., Mc GREGOR I. A. ⁽⁴⁾; TAYLOR A. C., LEHRFELD J. W. ⁽¹⁾].

2) l'osservazione del destino di omotrapianti ripetuti in uno stesso organismo e provenienti dal medesimo donatore. Il secondo innesto muore in un tempo nettamente inferiore a quello in cui si verificò la necrosi del primo frammento perchè l'individuo ricettore avrebbe già approntato gli anticorpi e non necessiterebbe quindi più l'usuale periodo di latenza a che la reazione antigene-anticorpo si scateni [GIBSON T., MEDAWAR P. B. ⁽⁵⁾; BAXTER H., ENTIN M. A. ⁽⁶⁾; DEMPSTER J. W. ⁽⁷⁾;

SPARROW E. M. ⁽⁸⁾; BILLINGHAM R. E., BRENT L., MEDAWAR P. B. ⁽⁹⁾
HILDEMAN W. H. ⁽¹⁰⁾].

3) l'aumento degli eosinofili, dei linfociti e delle cellule del plasma a livello dell'omoinnesto nel periodo che precede la sua distruzione [ROGERS R. O., CONVERSE J. M., TAYLOR A. C., CAMPBELL R. M. ⁽¹¹⁾].

4) il costante aumento delle gamma-globuline dell'organismo ospite ed il caso significativo di GOOD R., VARCO R. ⁽¹²⁾ che per primi ottennero un buon attecchimento di omoinnesti di cute in un bimbo in stato di agammaglobulinemia.

5) i favorevoli risultati ottenuti scambiando tessuti ed organi fra gemelli monozigoti per la identità della costituzione genetica esistente fra datore e ricevente [CONVERSE J. M., DUCHET G. ⁽¹³⁾].

I vari meccanismi della reazione dell'ospite all'omoinnesto sono quindi da ricondursi alla categoria delle risposte da immunità attiva acquisita ed i dati che siamo andati fin qui elencando rivestono notevole importanza e confortano in modo alquanto soddisfacente la veridicità di tale teoria. Non vi è dubbio però che una sua dimostrazione diretta ed inequivocabile potrebbe aversi solamente riuscendo a mettere in evidenza, nel soggetto che abbia ricevuto un innesto omoplastico, la presenza di anticorpi specifici.

Nel corso degli ultimi anni sono già stati condotti in realtà tentativi in tal senso. MEDAWAR P. B. ⁽¹⁴⁾ tentava la dimostrazione della incompatibilità all'omotraspianto mediante colture di pelle in presenza del siero di conigli specificamente immunizzati senza trarne però risultati positivi. ALLGOWER M., BLOCKER T. G., DENGLEY B. W. ⁽¹⁵⁾ dimostravano, negli animali da esperimento, la formazione di precipitine e citotossine dopo immunizzazione con estratti di cute eterologa ma non con estratti di cute omologa. Alcuni interessanti lavori venivano condotti con l'ausilio di speciali camere di diffusione a membrane porose impenetrabili alle cellule [ALGIRE G. H., WEAVER J. M., PREHN R. T. ⁽¹⁶⁾; WEAVER J. M., ALGIRE G. H., PREHN R. T. ⁽¹⁷⁾]. Tali camere, contenenti dei tessuti omoplastici, venivano poste nell'interno del corpo di alcuni topi. Se l'animale era stato previamente sensibilizzato i tessuti omologhi contenuti nelle camere di diffusione venivano ad essere distrutti dimostrando quindi la reale presenza di citotossine capaci di superare i pori delle membrane.

BILLINGHAM R. E., SPARROW E. M. ⁽¹⁸⁾ sperimentavano con una sospensione di cellule dell'epidermide di coniglio ottenuta mediante trattamento con tripsina. Le cellule, poste ad incubare in siero di coniglio normale non presentavano variazione alcuna mentre, se erano messe a

contatto con siero di coniglio sensibilizzato con la medesima pelle mostravano segni di grave sofferenza fino alla morte. Tali esperimenti, in realtà assai suggestivi, non ricevevano però successivamente il conforto positivo di altri sperimentatori.

Alquanto recentemente BALLAG W. ⁽¹⁹⁾, facendo uso di una speciale tecnica nefelometrica, riusciva a dimostrare nel siero di coniglio che aveva ricevuto un innesto omologo di cute la presenza di un anticorpo termolabile, non dializabile e capace di reagire con tutti gli organi del donatore.

Queste sono state le basi e le premesse che ci hanno indotti ad intraprendere il presente lavoro sperimentale con lo scopo precipuo di mettere in evidenza la presenza di eventuali anticorpi specifici nel siero di soggetti che abbiano preventivamente ricevuto un innesto omologo di pelle.

MATERIALI E METODI

Le esperienze venivano condotte su due pazienti volontari, senza alcun rapporto di consanguineità fra loro, ambedue di sesso maschile, rispettivamente di 40 e 28 anni di età, portatori di ulcere post-flebitiche agli arti inferiori e ricoverati, presso l'Istituto di Clinica Chirurgica nella medesima epoca.

Il prelievo dei lembi dermo-epidermici veniva eseguito, rispettando le più rigorose regole dell'asepsi, dalla faccia anteriore delle cosce facendo uso di un dermatomo elettrico. Le zone ulcerate, opportunamente escisse, venivano ricoperte mediante innesti autologhi tranne che per un tratto irregolarmente quadrangolare di cm. 4 × 6 circa ove veniva posto un innesto di cute omologa ricavata cioè dall'altro paziente. La medicazione compressiva veniva eseguita mediante moulage con garza vasellinata.

Nella fase del prelievo dei lembi dermo-epidermici si aveva cura di ricavarne un tratto in eccedenza, della grandezza di cm. 6 × 6 circa, e che sarebbe servito poi, nelle prove di laboratorio, per allestire l'antigene.

Immediatamente prima dell'intervento ed in II - III - XII - XV e XXI giornata del decorso postoperatorio i pazienti venivano sottoposti al prelievo di pochi cm³ di sangue allo scopo di poter ricavare il siero per la ricerca degli anticorpi specifici.

Il destino dei frammenti omoplastici fu, per entrambi i casi, quello della lisi completa in circa 18-20 giorni. All'atto della prima medicazione, effettuata in settima giornata, gli omoinnesti si presentavano in

soddisfacenti condizioni di attecchimento: il colorito era roseo, la superficie leggermente umida, la adesione ai piani sottostanti perfetta. Successivamente, dalla dodicesima giornata in poi, i tratti di cute omoplastica cominciavano ad impallidire e ad assottigliarsi progressivamente. I bordi, leggermente sollevati sul piano sottostante, lasciavano intravedere una incipiente epitelizzazione sotto lembo. La lisi, come già detto, si completava poi in circa 20 giorni.

Ambedue i casi venivano documentati con fotografie eseguite immediatamente prima dell'intervento ed in VII e XXI giornata del decorso postoperatorio. Data la analogia dei risultati abbiamo ritenuto però superfluo pubblicare la iconografia di entrambi, limitandoci a quella relativa al primo dei due pazienti operati (Fig. 1, 2, 3).

Per le ricerche « in vitro » degli anticorpi causa di tale lisi il materiale necessario era l'antigene, costituito da un lisato di cute del donatore e che era così preparato. La cute veniva finemente tagliata, pestata in un mortaio, addizionata a soluzione fisiologica, macerata per 48 h. a 4°C e di poi minuziosamente spappolata in un turmix. Il mestruo così ottenuto era filtrato per carta e costituiva l'antigene. Il valore in azoto totale di tale lisato veniva determinato per mezzo del micro-Kjeldahl.

Per quanto riguardava il siero nel quale dovevano essere ricercati gli eventuali anticorpi specifici, questo era ottenuto per salasso di pochi cm³ di sangue dal paziente che aveva ricevuto l'omoinnesto. I salassi, come detto, venivano praticati prima dell'intervento (presiero) e rispettivamente dopo 2, 3, 12, 15, 21 giorni. I sieri così ottenuti venivano inattivati a 56°C per 30' e conservati a 4°C fino al momento dell'uso.

TECNICHE USATE

Le tecniche scelte per cercare di mettere in evidenza, ed eventualmente titolare, gli anticorpi presenti nei sieri in esame sono state: 1) la siero precipitazione in provetta; 2) la siero precipitazione in agar; 3) la emoagglutinazione con emazie tannizzate.

1) La siero precipitazione in provetta consiste nello stratificare il siero in esame, facendolo scorrere lungo le pareti della provetta, sotto l'antigene. In caso di positività, nel punto di contatto tra i liquidi (antigene e anticorpo) viene a formarsi un bianco anello di materiale precipitato. Diluendo progressivamente il siero in esame è possibile dare un valore quantitativo agli eventuali anticorpi presenti.

2) La precipitazione in agar o metodo di OUCHTERLONY O. ^(20, 21) si basa sullo stesso principio. Tuttavia la possibilità di aggiungere nei pozzetti sia l'antisiero che l'antigene, man mano che essi evaporano o si diffondono nell'agar, rende possibile rivelare, sia pure con più ritardo ma con materiale più concentrato e per un periodo più lungo di osservazione, la presenza di anticorpi.

3) L'emoagglutinazione con emazie tannizzate o metodo Boyden si è rivelata la tecnica di gran lunga più sensibile nel mettere in evidenza quantità minime sia di anticorpi che di antigeni. La tecnica da noi usata, partendo da quella originale di BOYDEN S. V. ⁽²²⁾ e STAVITSKY A. B. ⁽²³⁾, è stata modificata per i nostri scopi. Essa in sintesi è la seguente:

emazie di montone: sangue sterile defibrinato e conservato in soluzione di Alsever (una parte di sangue e due parti di soluzione d'Alsever);

sieri in esame: inattivati a 56°C per 30' e conservati a 4°C;

antigene: lisato di cute titolato in azoto totale a mezzo micro-Kjeldahl;

acido tannico Merck: diluizione 1:20.000 in soluzione fisiologica;

preparazione delle emazie di montone: centrifugazione delle emazie a 2.000 giri per 5' e successivo lavaggio, per tre volte, con soluzione fisiologica. Delle emazie così lavate se ne prendono 1 cm³ che va sospeso in 40 cm³ di soluzione tamponata a pH 7,2 e va usato entro le 24 h;

preparazione delle emazie tannizzate: 1 cm³ delle emazie diluite come sopra vengono addizionate ad 1 cm³ di acido tannico diluito 1 : 20.000 e tenute a 37°C per 10'. Dopo tale trattamento esse vengono centrifugate a 1.500 giri per qualche minuto, lavate con 1 cm³ di soluzione tamponata a pH 7,2 e risospese in 1 cm³ di soluzione fisiologica;

sensibilizzazione delle emazie con antigene e siero umano: a 4 cm³ di soluzione tamponata a pH 6,4 vengono addizionati 1 cm³ di antigene diluito 1 : 2 ed 1 cm³ di emazie tannizzate. Il tutto viene lasciato per 10-15 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugato a 1.500 giri per 5' e lavato due volte con 2 cm³ di siero normale di coniglio diluito 1 : 100 previamente inattivato. Il materiale così ottenuto viene addizionato di 1 cm³ di siero normale umano diluito 1 : 10 ed inattivato, centrifugato, lavato e risospeso in 1 cm³ di siero normale di coniglio diluito 1 : 100. Quest'ultima operazione, con siero umano, ha lo scopo di bloccare i ricettori di specificità umana eventualmente capaci di reagire con il siero in esame e falsare quindi i risultati;

saturazione degli anticorpi eterofili del siero in esame: avendo no-

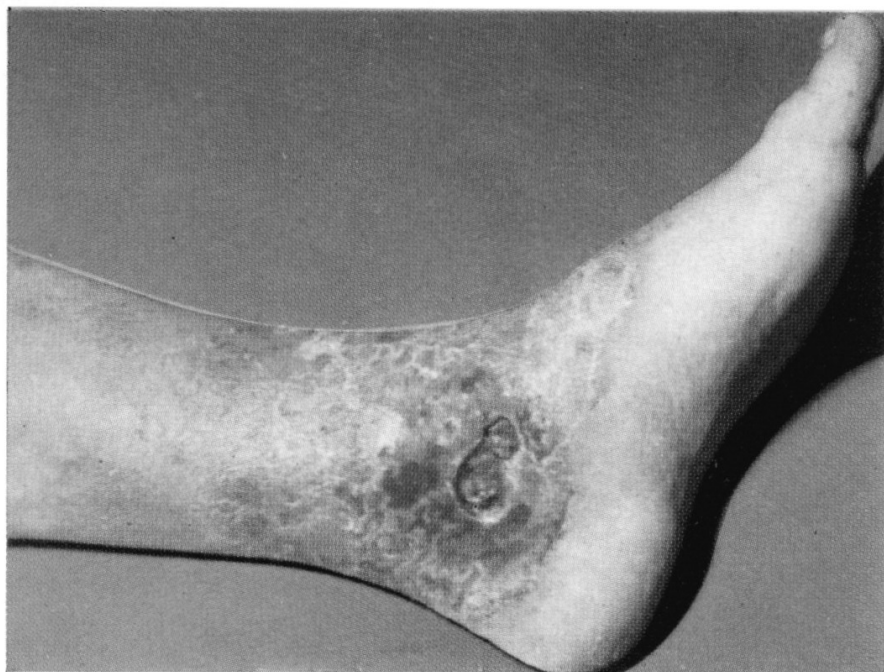


Fig. 1 - Condizioni pre-operatorie.

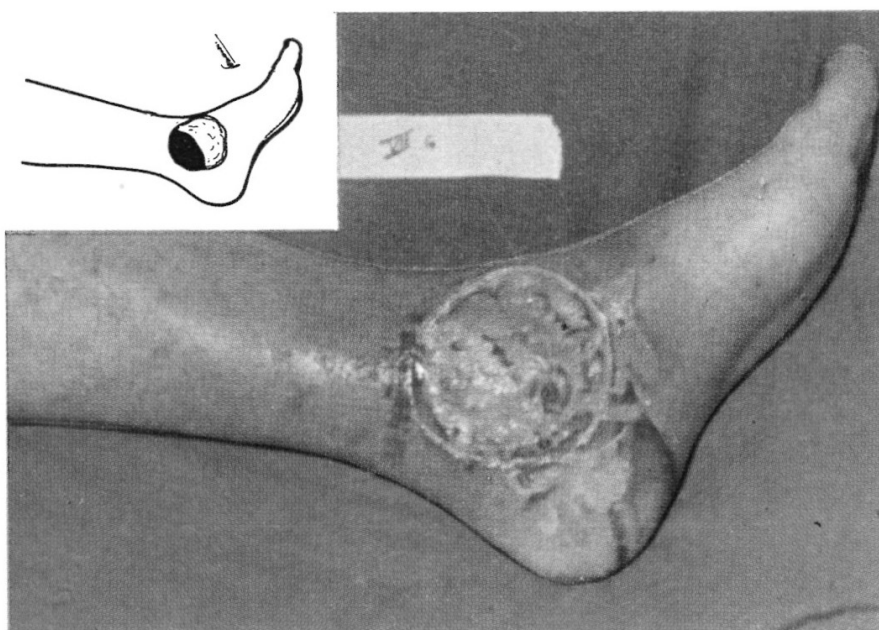


Fig. 2 - Fotografia eseguita all'atto della prima medicazione (VII giornata del decorso postoperatorio).

La zona in nero corrisponde alla sede dello omoinnesto che appare in buone condizioni di attecchimento.

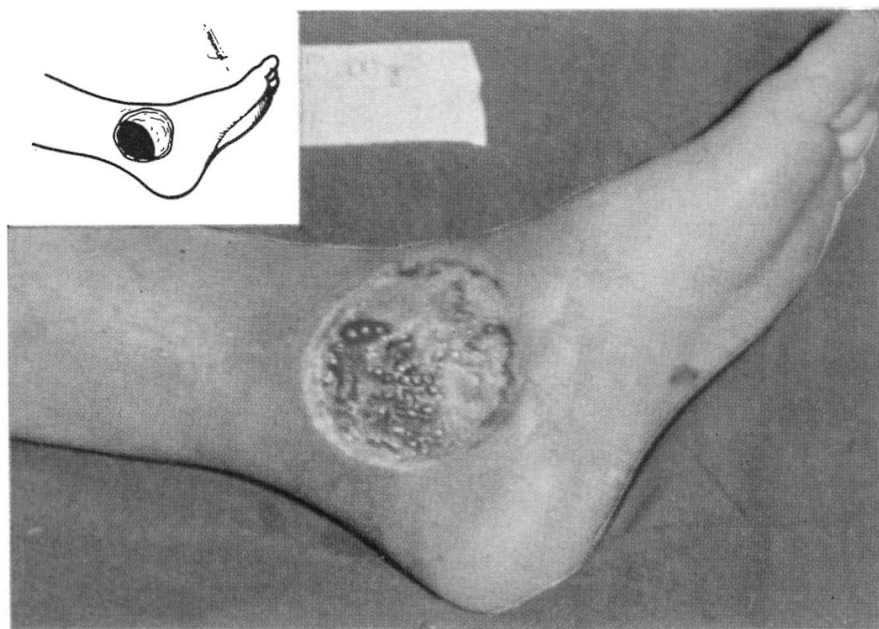


Fig. 3 - Fotografia eseguita in XXI giornata del decorso postoperatorio.

L'omoinnesto, corrispondente alla zona in nero, è andato completamente perduto. Soddisfacente lo stato di attecchimento dell'innesto autologo.

tato in prove preliminari, come il siero umano in esame contenesse alle volte degli anticorpi eterofili antimontone, si è resa necessaria la saturazione di tali anticorpi per evitare una falsa reazione. A tale scopo il siero umano in esame è stato trattato con antigene ottenuto da rene di cavia bollito e cellule bovine bollite (boiled beef cell antigen; e boiled guinea pig kidney antigen, Cappel Laboratories-West Chester Pennsylvania);

tecnica della reazione: la reazione veniva eseguita su piastre di perspex fornite di vaschette della capacità di circa $1,5\text{ cm}^3$ ciascuna. In ognuna di tali vaschette veniva posto $\text{cm}^3\ 0,5$ del siero da esaminare a diluizioni crescenti, più una goccia ($\text{cm}^3\ 0,05$) di emazie trattate. In pratica, nella reazione completa, entravano in gioco i seguenti elementi: siero umano in esame inattivato e saturato degli anticorpi eterofili, diluito in siero di coniglio $1 : 100$ + emazie tannizzate e sensibilizzate con antigene e siero umano normale diluito $1 : 10$.

Allo scopo di premunirci da eventuali possibili cause di errore venivano effettuati dei controlli così costituiti:

1) siero umano in esame inattivato e saturato per gli anticorpi eterofili diluito in siero di coniglio $1 : 100$ + emazie tannizzate;

2) siero umano in esame inattivato e diluito con siero di coniglio $1 : 100$ + emazie;

3) siero umano in esame inattivato e diluito in soluzione fisiologica + emazie.

RISULTATI

Le esperienze erano eseguite, come già detto, sul siero di sangue di due pazienti che avevano ricevuto, nella regione della gamba, un innesto omologo di pelle della grandezza di $\text{cm}\ 4 \times 6$ circa. I sieri prelevati in II e III ed in XII e XV giornata erano riuniti rispettivamente in due pool. Per ogni paziente venivano eseguite quindi quattro prove: presiero (siero prelevato prima dell'intervento operatorio), pool del siero in II e III giornata, pool del siero in XII e XV giornata, siero prelevato in XXI giornata.

Le prove di precipitazione sia in provetta che in agar per entrambi i sieri esaminati risultavano costantemente negative. Tali metodi si rivelavano quindi inidonei a mettere in evidenza gli anticorpi ricercati come del resto prevedibile trattandosi di antigeni ed antisieri appartenenti alla stessa specie zoologica (uomo).

L'emoagglutinazione con emazie tannizzate e sensibilizzate secondo

la tecnica sopra descritta risultava invece positiva con titoli che ci hanno permesso di valutare un certo movimento anticorpale. Nelle due seguenti tabelle sono riportati in sintesi i valori ottenuti:

SIERO N. 1

Giorni del prelievo siero	Titolo emoagglutinante	
presiero	—	
pool II - III giornata	+ 1:20	
pool XII - XV giornata	+ 1:120	+— 1:160
siero XXI giornata	+ 1:160	+— 1:320

Tutti i controlli praticati per il siero n. 1 risultavano costantemente negativi. Il valore in azoto dell'antigene era di mg. 0,465/cm³.

SIERO N. 2

Giorni del prelievo siero	Titolo emoagglutinante	
presiero	+— 1:10	
pool II - III giornata	+ 1:10	+— 1:15
pool XII - XV giornata	+ 1:60	+— 1:80
siero XXI giornata	+ 1:80	+— 1:120

Tutti i controlli risultavano anche in questo caso negativi ed il valore in azoto dell'antigene era di mg. 0,450/cm³.

CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati ottenuti ci induce ad alcune considerazioni:

1) nel soggetto che abbia ricevuto un innesto omoplastico si nota un movimento anticorpale che, pressocchè nullo nei primi giorni del decorso postoperatorio (titolo emoagglutinante massimo 1:20) aumenta poi progressivamente fino a dare delle positività a titolo assai elevato;

2) la quasi completa assenza di anticorpi specifici nel siero del ricettore in II e III giornata conforta l'osservazione clinica, da altri e da noi rilevata, di un soddisfacente stato di attecchimento dei trapianti omoplastici di cute nei primissimi giorni che seguono l'intervento operatorio (necessità di un periodo latente alla formazione dell'anticorpo e a che la reazione antigene-anticorpo si scateni);

3) lo scarto maggiore nell'aumento del titolo emoagglutinante del siero ha corrisposto con il periodo in cui l'osservazione macroscopica dei trapianti omoplastici ne metteva in evidenza un incipiente stato di sofferenza (XII-XV giornata, titolo emoagglutinante massimo $1:120 \pm 1:160$);

4) in ambedue i casi, sebbene in misura alquanto diversa, il titolo emoagglutinante dopo la XV giornata è andato ulteriormente aumentando fino a raggiungere, nella XXI giornata, la quota massima di $1:160$. Anche questo dato concorda con il periodo in cui fu osservata clinicamente la lisi completa degli innesti omoplastici;

5) per quanto sperimentassimo su soggetti volontari ci siamo astenuti dal prelevare lembi dermo-epidermici eccessivamente grandi. Tale limitazione non ci ha consentito di avere a disposizione quantità d'antigene sufficienti per saggiare il siero dei ricettori al di là della XXI giornata. Con ogni verosimiglianza, essendosi ormai completata la lisi dei trapianti omoplastici, avremmo potuto osservare una decrescenza graduale del titolo emoagglutinante. Tale ipotesi ci sembra sia consentita dall'accordo rilevato, nei giorni in cui la esperienza si è protratta, fra dati clinici e dati di laboratorio.

Purtroppo le esperienze sono state condotte su due soli soggetti ed i risultati ottenuti non ci permettono, di conseguenza, di trarre deduzioni generali e definitive.

Ci auguriamo che il metodo da noi proposto possa venire adottato e perfezionato da altri per far meglio luce sull'argomento.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.

Roma — Istituto di Clinica Chirurgica Generale e Terapia Chirurgica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) TAYLOR A. C. e LEHRFELD J. W. - *Plast. reconstr. Surg.*, 12: 423 (1953).
- (²) MEDAWAR P. B. - *J. Anat. Lond.*, 78: 176 (1944).
- (³) MEDAWAR P. B. - *J. Anat. Lond.*, 79: 157 (1945).
- (⁴) SCOTHORNE R. J. e MC GREGOR I. A. - *J. Anat. Lond.*, 87: 379 (1953).
- (⁵) GIBSON T. e MEDAWAR P. B. - *J. Anat. Lond.*, 77: 299 (1943).
- (⁶) BAXTER H. e ENTIN M. A. - *Am. J. Surg.*, 81: 285 (1951).

- (7) DEMPSTER J. W. - Brit. J. Surg., 40: 447 (1953).
 - (8) SPARROW E. M. - Endocrinol., 9: 101 (1953).
 - (9) BILLINGHAM R. E., BRENT L. e MEDAWAR P. B. - Proc. roy. Soc. B., 143: 58 (1954).
 - (10) HILDEMAN W. H. - N. Y. Acad. Sci., 64: 775 (1957).
 - (11) ROGERS B. O., CONVERSE J. M., TAYLOR A. C. e CAMPBELL R. M. - Proc. Soc. exp. Biol., 82: 523 (1953).
 - (12) GOOD R. e VARCO R. - J. am. med. Ass., 157: 713 (1955).
 - (13) CONVERSE J. M. e DUCHET G. - Plast. reconstr. Surg., 2: 342 (1947).
 - (14) MEDAWAR P. B. - Brit. J. Exp. Path., 29: 58 (1948).
 - (15) ALLGOWER M., BLOCKER T. G. e DENGLEY B. W. D. - Plast. reconstr. Surg., 9: 1 (1952).
 - (16) ALGIRE G. H., WEAVER J. M. e PREHN R. T. - J. nat. Cancer Inst., 15: 493 (1954).
 - (17) WEAVER J. M., ALGIRE G. H. e PREHN R. T. - J. nat. Cancer Inst., 15: 1737 (1955).
 - (18) BILLINGHAM R. E. e SPARROW E. M. - Brit. J. exp. Biol., 31: 16 (1954).
 - (19) BOLLAG W. - Experientia, 12: 57 (1956).
 - (20) OUCHTERLONY O. - Atti VI Congr. Int. Microb. Roma, 2: 276 (1953).
 - (21) OUCHTERLONY O. - Acta path. microbiol. scand., 32: 231 (1953).
 - (22) BOYDEN S. V. - J. exp. Med., 93: 107 (1951).
 - (23) STAVICTSKY A. B. - J. Immunol., 72: 360 (1954).
-