

70. M. BOCCACCI, G. FERRETTI (*) e M. QUINTILIANI. — Incorporazione in *Hymenolepis nana* di costituenti alimentari marcati con C¹⁴ somministrati all'ospite. - Nota I.

Riassunto. — Prodotti marcati con C¹⁴ (amido, glucosio, alghe, proteine denaturate di alghe e relativo idrolisato) sono stati somministrati a topini infestati con *Hymenolepis nana*. E' stata determinata la aliquota di sostanza radioattiva incorporata nei parassiti in forma non solubile dopo fissazione con alcool etilico-acido acetico e prolungato lavaggio in acqua corrente. Vengono riportati i valori relativi, riferiti sia al peso secco dei parassiti, sia alla quantità di sostanza radioattiva somministrata. La incorporazione maggiore di sostanza radioattiva nei parassiti si è avuta dopo la somministrazione di amido, quella minore dopo somministrazione di glucosio: negli altri casi si sono avuti valori intermedi, in proporzione maggiori dopo la somministrazione di alghe che non dopo la somministrazione di proteine denaturate o di idrolisato proteico.

Summary. — C¹⁴ labelled substances (starch, glucose, algae, denatured proteins from algae and their hidrolysate) have been given by mouth to mice infested by *Hymenolepis nana*. The amount of radioactivity incorporated by the parasites in insoluble form has been determined after fixation in acetic acid-ethanol and prolonged washing in running water. The values of incorporation expressed both as c.p.m. per mg of dry weight of parasites and as percentage of the administered radioactivity, are reported. The maximum incorporation has been observed after the administration of starch, the minimum after the administration of glucose: in the other cases intermediary values have been observed higher after the administration of algae, lower after the administration of denatured proteins or protein hidrolysate.

E' noto che tra i diversi meccanismi con i quali i parassiti esercitano la loro azione patogena nei confronti dell'ospite, la azione sottrattiva può assumere particolare rilievo. Limitandosi a considerare gli elminti parassiti dell'apparato digerente, si può schematicamente considerare che la azione sottrattiva si espliciti con due meccanismi sostanzialmente

(*) Assistente presso l'Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma.

diversi: mediante la ingestione del sangue che fuoriesce da lesioni di continuo della mucosa intestinale provocate dallo stesso parassita o più spesso mediante l'assorbimento da parte del parassita di sostanze presenti nel chimo che transita nel lume intestinale. Nel primo caso i parassiti potranno determinare uno stato di anemia proporzionale alla quantità di sangue sottratta, che può essere considerevole in quanto ad es. sono tutt'altro che rari i casi di infestazioni determinate da parecchie decine di *Anchilostomi*, ciascuno dei quali può sottrarre circa 0,7 ml di sangue al giorno ⁽¹⁾; nel secondo caso invece i danni arrecati all'ospite saranno in relazione alla quantità ed al tipo delle sostanze sottratte.

E' stato dimostrato che in alcuni casi la azione sottrattiva esercitata dai parassiti nell'assorbimento delle sostanze presenti nel contenuto intestinale può essere nettamente selettiva, determinando precisi e gravi disturbi da carenza all'ospite: così NYBERG ⁽²⁾ ha messo in evidenza che l'anemia perniciosiforme che si riscontra nei soggetti parassitati da *Diphyllobothrium latum* è in relazione con il fatto che il parassita sottrae una aliquota notevole, che corrisponde in media al 44,3% ma che può essere anche più considerevole (fino all'88%), della vitamina B₁₂ ingerita dai soggetti parassitati. Peraltro le nostre conoscenze sulla entità e sul tipo della azione sottrattiva esercitata dai parassiti sono relativamente assai scarse anche se la possibilità di impiegare in queste ricerche dei composti marcati con isotopi radioattivi permette oggi di affrontare il problema in modo sistematico. Nella presente nota vengono riferiti i primi risultati di ricerche condotte al fine di determinare l'entità della azione sottrattiva esercitata nei confronti dell'ospite da *Hymenolepis nana*, cestode parassita di diversi mammiferi e dell'uomo, nel quale è notevolmente diffuso specie in alcune regioni nelle quali l'imenolepiasi è stata riscontrata nella metà dei bambini esaminati ⁽³⁾.

MATERIALE E METODI.

Il ceppo di *Hymenolepis nana* adoperato per le esperienze, isolato dall'uomo oltre due anni fa, viene conservato mediante passaggio su animali: ogni mese dei topini appena svezzati vengono infestati con la somministrazione di feci di animali parassitati frammiste a mangime. Per le nostre esperienze sono state somministrate a ciascun topino in media 15-20 uova di *H. nana*.

Per le esperienze sono stati adoperati topini di sesso maschile (ceppo Swiss, allevamento dell'Istituto Superiore di Sanità) infestati da 18-22 giorni: l'infestazione veniva controllata con la ricerca delle uova nelle

feci. Agli animali che risultavano adeguatamente infestati, dopo 4-8 ore di digiuno veniva somministrata la sostanza marcata incorporata in un cubetto di pane raffermo preparato come indicato più sotto. Gli animali sono stati sacrificati 6 ore dopo il pasto o, per alcune prove, dopo un intervallo di tempo maggiore. I parassiti venivano raccolti, lavati e fissati in alcool etilico-acido acetico (2 parti di alcool etilico assoluto e 1 parte di acido acetico glaciale) e successivamente lavati per 48 ore in acqua corrente. Il lavaggio dopo fissazione aveva lo scopo di allontanare ogni traccia di sostanza radioattiva ancora presente allo stato solubile.

I parassiti erano quindi posti per 24 ore in una soluzione di gelatina al 2 per mille contenente lo 0,2 per mille di allume di cromo per facilitarne l'adesione a dischetti di vetro sui quali venivano depositi ed infine essiccati su anidride fosforica. Si procedeva quindi alla misura della radioattività.

PRODOTTI RADIOATTIVI.

Sono stati impiegati i seguenti prodotti marcati con C^{14} , forniti dal Radiochemical Centre di Amersham (Inghilterra): D-Glucose- C^{14} (U) 3 mc/mM; Starch- C^{14} (U) 20 μ c/mg; Algal protein (denatured)- C^{14} (U) 30 μ c/mg; Algae- C^{14} (U) (*Chlorella vulgaris*) 30 μ c/mg; Algal protein hydrolisate- C^{14} (U) 30 μ c/mg.

Le soluzioni o sospensioni sono state preparate come segue:

glucosio ed idrolisato proteico: una quantità di prodotto marcato corrispondente a 100 μ c veniva disciolta in 4 ml di soluzione acquosa contenenti rispettivamente 100 mg di glucosio inerte o 100 mg di idrolisato di lattalbumina inerte;

amido, proteine ed alghe: ad una quantità di prodotto marcato corrispondente a 100 μ c venivano aggiunti rispettivamente 100 mg di amido, di albumina bovina denaturata o di lievito secco (*Saccharomyces cerevisiae*); il tutto veniva sospeso in 4 ml di acqua distillata ed omogeneizzato in un apparecchio di Potter-Elvehjem.

A ciascun animale in esperimento venivano somministrati, facendoli previamente assorbire da un cubetto di pane raffermo di circa 1 cm di lato, 0,15 ml della soluzione o della sospensione corrispondenti a 3,75 μ c di prodotto marcato.

La radioattività è stata misurata con una apparecchiatura convenzionale con tubo di Geiger a finestra sottile di mica. Nelle nostre condizioni sperimentali si è ottenuta una efficienza complessiva del 2,7%.

I valori della radioattività sono stati riferiti al peso secco dei parassiti, senza tener conto del loro numero: è noto infatti che nei casi di

infestazione da Cestodi il grado di sviluppo raggiunto dai singoli parassiti può variare in modo assai considerevole, per cui riferendo i valori di radioattività riscontrati al numero dei parassiti rinvenuti si sarebbero avuti dati assai meno significativi.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Sei ore dopo la somministrazione ai topini di sostanze marcate con C^{14} è stata riscontrata una aliquota della radioattività nei parassiti raccolti e trattati come sopra descritto: i valori della radioattività, riferiti al peso secco di tutti gli esemplari di *H. nana* raccolti in ciascun topino, sono riportati nella prima colonna della tabella 1. Appare evidente come

TABELLA 1

Radioattività fissata da *H. nana* dopo somministrazione ai topini di varie sostanze marcate con C^{14} .

	Radioattività specifica i. p. m./mg di peso secco $\pm$ errore standard	Percentuale del sommi- nistrato incorporata. Media (val. minimo e massimo) $\times 10^3$	N. di animali in esperim.
Alghe	$19,6 \pm 2,6$	43 (18 — 140)	10
Proteine	$8,6 \pm 0,9$	30 (17 — 53)	16
Idrolisato proteico	$10,4 \pm 1,5$	32 (16 — 69)	19
Amido	$29,6 \pm 4,3$	78 (37 — 190)	19
Glucosio	$4,7 \pm 0,7$	13 (5 — 24)	14

l'aliquota di sostanza radioattiva incorporata presenti notevoli variazioni in relazione alle diverse sostanze somministrate: i valori più elevati si hanno nel caso di somministrazione di amido, mentre i valori più bassi si hanno con la somministrazione di glucosio: la differenza tra i dati relativi è altamente significativa. Analogamente si ha una incorporazione notevolmente più elevata nel caso di somministrazione di alghe di quanto non si riscontri con la somministrazione di proteine: anche in questo caso le differenze sono altamente significative. Assai più modeste, invece, le differenze riscontrate nel caso di somministrazione di proteine e di idrolisato proteico.

La interpretazione di questi dati non si presenta agevole. La differenza riscontrata tra l'amido ed il glucosio può essere spiegata considerando che, trovandosi di regola i parassiti nella seconda parte dell'intes-

stino tenue, la maggior parte del glucosio venga assorbito nei tratti più prossimali dell'intestino stesso in modo che ai parassiti ne giunga soltanto un'aliquota relativamente modesta, mentre per l'amido, poichè i processi idrolitici avvengono anche nel tenue, si ha una più elevata concentrazione del monosaccaride a livello dei parassiti.

Tra i valori della radioattività riscontrati dopo somministrazione di proteine e rispettivamente di idrolisato proteico, non si riscontra invece una differenza altrettanto evidente di quella riscontrata tra amido e glucosio: questo diverso comportamento non appare spiegabile sulla base dei dati dei quali disponiamo sino a questo momento. I valori della radioattività riscontrati dopo la somministrazione di alghe sono intermedi tra quelli riscontrati per l'amido e per le proteine, come si poteva presumere considerando che nelle alghe sono presenti entrambi i gruppi di composti.

Nella seconda colonna della tabella sono riportati i dati relativi alla aliquota di sostanza radioattiva incorporata dai parassiti. Tra i valori minimo e massimo si notano differenze considerevoli, dovute principalmente al fatto che nei diversi animali in esperimento si trovava un differente numero di parassiti e che i parassiti stessi erano differentemente sviluppati: alla variabilità fra i dati relativi alla sostanza radioattiva sottratta fa riscontro una variabilità relativamente modesta fra i valori della radioattività specifica. Circa l'entità della azione sottrattiva esercitata dai parassiti, è da tener presente che i valori riportati si riferiscono solo alla aliquota della sostanza incorporata in modo tale da non essere solubile dopo l'azione del fissativo impiegato: il fatto che nei primi liquidi di lavaggio fossero presenti livelli di radioattività non trascurabili permette di presumere che una aliquota di sostanza radioattiva sia assorbita dal parassita ma non venga incorporata sotto forma di sostanze non solubili nelle nostre condizioni sperimentali.

Nella tabella 2 infine vengono riportati i dati di esperienze effettuate sacrificando i topini e prelevando i parassiti a tempi diversi dopo la

TABELLA 2

Radioattività in *H.nana* a vari tempi dalla somministrazione di proteine marcate con C^{14} .
Radioattività specifica: i.p.m./mg di peso secco $\pm$ errore standard.

Ore trascorse dal trattamento	6	12	24	48 (*) (2 somministraz.)
	12,1 $\pm$ 2,1 (6)	15,6 $\pm$ 2,6 (6)	11,0 $\pm$ 1,2 (6)	29,0 $\pm$ 5,0 (5)
$P < 0,001$				

(*) La seconda somministrazione di proteine marcate è stata fatta a distanza di 24 ore dalla prima.

I numeri tra parentesi indicano gli animali in esperimento.

somministrazione all'ospite di proteine di alghe marcate con C^{14} . Le differenze nei valori della radioattività riscontrati sino a 24 ore dopo il trattamento non sono significative, mentre si rileva che ad una seconda somministrazione del prodotto marcato, fatta 24 ore dopo la prima, corrisponde un valore pressochè doppio della radioattività riscontrata nei parassiti.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica biologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) FAUST E. C. e RUSSEL P. F. - « Craig and Faust's Clinical Parasit. » - Lea and Febiger, Philadelphia, 6^a ed. 1957.
 - (²) NYBERG W. - Exp. Parasit., 7: 178 (1958).
 - (³) PAMPIGLIONE S., DI FELICE G. e FERRETTI G. - In corso di stampa.
-