

## La misura della produzione di superossido anione ( $O_2^-$ ) dei granulociti di sangue intero come test di valutazione della funzionalità fagocitaria

*The measurement of the superoxide anion production by whole blood granulocytes as a test for the evaluation of the phagocytic function*

\*P. Dri, \*\*P. Bellavite, V. Della Bianca, \*A. Comin

\* Istituto di Patologia Generale dell'Università di Trieste

\*\*Istituto di Patologia Generale dell'Università di Padova, sede di Verona

La fagocitosi è uno dei meccanismi più importanti per la difesa dell'organismo contro l'aggressione dei batteri. Difetti della funzionalità dei fagociti sono infatti frequentemente associati ad una aumentata suscettibilità alle infezioni. L'uccisione dei microorganismi da parte dei fagociti è il risultato finale di un processo sequenziale di eventi le cui tappe principali sono: 1) il movimento del fagocita verso la particella da fagocitare (chemiotassi); 2) l'opsonizzazione della particella da parte di fattori plasmatici; 3) l'ingestione della particella opsonizzata; 4) l'attivazione del metabolismo ossidativo del fagocita; e, 5) il rilascio di enzimi granulari. Difetti a livello di una qualsiasi di queste tappe risultano in una diminuzione della capacità di eliminazione dei micro-organismi. Una valutazione il più esauriente possibile della funzionalità fagocitaria, richiederebbe, quindi, la misura di ogni singola tappa del processo e quindi l'esecuzione di diversi tests. Nella pratica clinica ciò non è possibile, soprattutto per la natura complessa di tali tests, che in molti casi richiedono una strumentazione particolare, i lunghi tempi di esecuzione e la conseguente difficoltà di applicazione su vasta scala.

Nell'intento di ovviare ad alcune di queste difficoltà, abbiamo messo a punto un test di valutazione della funzionalità granulocitaria che si basa sulla misura nell'anione superossido ( $O_2^-$ ), uno dei prodotti del metabolismo ossidativo dei fagociti. In condizioni di riposo, la quantità di  $O_2^-$  prodotto dai fagociti è trascurabile. Essa aumenta considerevolmente quando i fagociti stessi vengono stimolati con particelle fagocitabili o con particolari sostanze solubili capaci di interagire con la membrana plasmatica (una delle più potenti di tali sostanze è il forbolo-12-miristato-13-acetato (PMA). La quantità di  $O_2^-$  prodotto viene determinata misurando spettrofotometricamente la riduzione del citocromo c dipendente da  $O_2^-$ .

Il test ha i seguenti vantaggi: 1) non richiede l'isolamento dei granulociti in quanto può essere eseguito con sangue intero, 2) è di semplice esecuzione e non necessita di particolari apparecchiature (sono sufficienti un bagno termostato a scuotimento, una centrifuga e uno spettrofotometro), e, 3) può essere eseguito in tempi relativamente brevi (2 ore circa).

La Figura 1 rappresenta schematicamente le fasi di esecuzione del test di misura dell' $O_2^-$  prodotto dai granulociti del sangue intero in presenza di zimosan (la scelta dello zimosan, quale particella fagocitabile, è determinata dal fatto che l'ingestione di tale particella e la conseguente stimolazione metabolica dei granulociti è strettamente dipendente dalla sua opsonizzazione, che avviene ad opera del frammento C3b, prodotto in seguito all'attivazione della via alternativa del complemento da parte dello zimosan stesso). I dettagli sperimentali sono già stati descritti altrove (1,2). Qui ci limiteremo ad una descrizione molto semplificata della metodica in questione e alla presentazione di una serie di risultati ottenuti con soggetti normali e con pazienti affetti da varia patologia.

La provetta A contiene sangue eparinato (0.2 ml), 0.8 ml di soluzione Krebs-Ringer fosfato pH 7.4 contenente 0.5 mM  $CaCl_2$  e 5 mM glucosio, 3 mg di citocromo c e 1 mg di zimosan non opsonizzato (l'opsonizzazione avviene durante l'incubazione con il sangue). La provetta B, allestita in parallelo alla A, contiene inoltre 50  $\mu$ g di superossido dismutasi (SOD). Nella provetta A il citocromo c viene ridotto dall' $O_2^-$  prodotto dai fagociti e da eventuali altre sostanze riducenti presenti nel mezzo, mentre nella provetta B il citocromo c viene ridotto solamente da queste ultime in quanto la SOD impedisce che l' $O_2^-$  formato vada a ridurre il citocromo c. Il valore reale di  $O_2^-$  prodotto si ottiene dalla differenza fra il citocromo c ridotto nella provetta A e quello ridotto nella provetta B. Dopo incubazione per 15 min a 37° C, in agitazione costante, la reazione viene bloccata con 4 ml di soluzione di Krebs-Ringer fosfato pH 7.4 fredda (4°C), si centrifugano le provette e si legge l'assorbanza dei supernatanti a 550 e 468 nm. Con il calcolo riportato nella Figura 1 si risale alla quantità di citocromo c ridotto (che corrisponde all' $O_2^-$  prodotto dai fagociti) per 0.2 ml di sangue. I valori vengono poi espressi per milione di granulociti in base alla conta e alla formula leucocitaria.

Una mancata o ridotta produzione di  $O_2^-$  rispetto ai valori di controllo indica che ci può essere un difetto della capacità opsonizzante (da complemento) del plasma o della funzionalità dei granulociti o di entrambi. Queste tre possibilità possono essere distinte allestendo un «test in due fasi». Nella prima fase si opsonizzano due aliquote di zimosan con il plasma del controllo e del paziente, rispettivamente. Nella seconda, ciascuna di queste preparazioni di zimosan opsonizzato viene impiegata per stimolare la produzione di  $O_2^-$  sia da parte dei granulociti del controllo che di quelli del paziente (in questo caso, non può essere usato il sangue intero in quanto contiene il plasma. Si possono isolare i granulociti per sedimentazione con destrano, oppure più semplicemente usare il sangue privato del plasma mediante due lavaggi con soluzione di Krebs-Ringer fosfato pH 7.4 contenente 0.5 mM  $CaCl_2$  e 5 mM glucosio. Tale soluzione viene poi usata anche per ripristinare il plasma rimosso).

I possibili risultati ottenibili con questo «test in due fasi» sono schematizzati nella Tabella I. La presenza di un difetto a livello cellulare (colonna I) viene evidenziata dalla deficitaria produzione di  $O_2^-$  da parte dei leucociti del paziente, stimolati con zimosan opsonizzato sia con il plasma del paziente che con il plasma del controllo. In presenza di un difetto di opsonizzazione (difetto umorale, colonna II) ci sarà una difettosa produzione di  $O_2^-$ , sia da parte dei leucociti del controllo che di quelli del paziente in presenza di zimosan opsonizzato con il plasma del paziente. Infine se ci troviamo contemporaneamente in presenza di un difetto umorale e cellulare (colonna III), si avrà scarsa produzione di  $O_2^-$  da parte dei leucociti del paziente in tutte le condizioni e dei leucociti del controllo in presenza di

Tab. - I

Test in due fasi per la discriminazione fra i difetti di natura cellulare e umorale della funzione fagocitaria: risultati possibili.

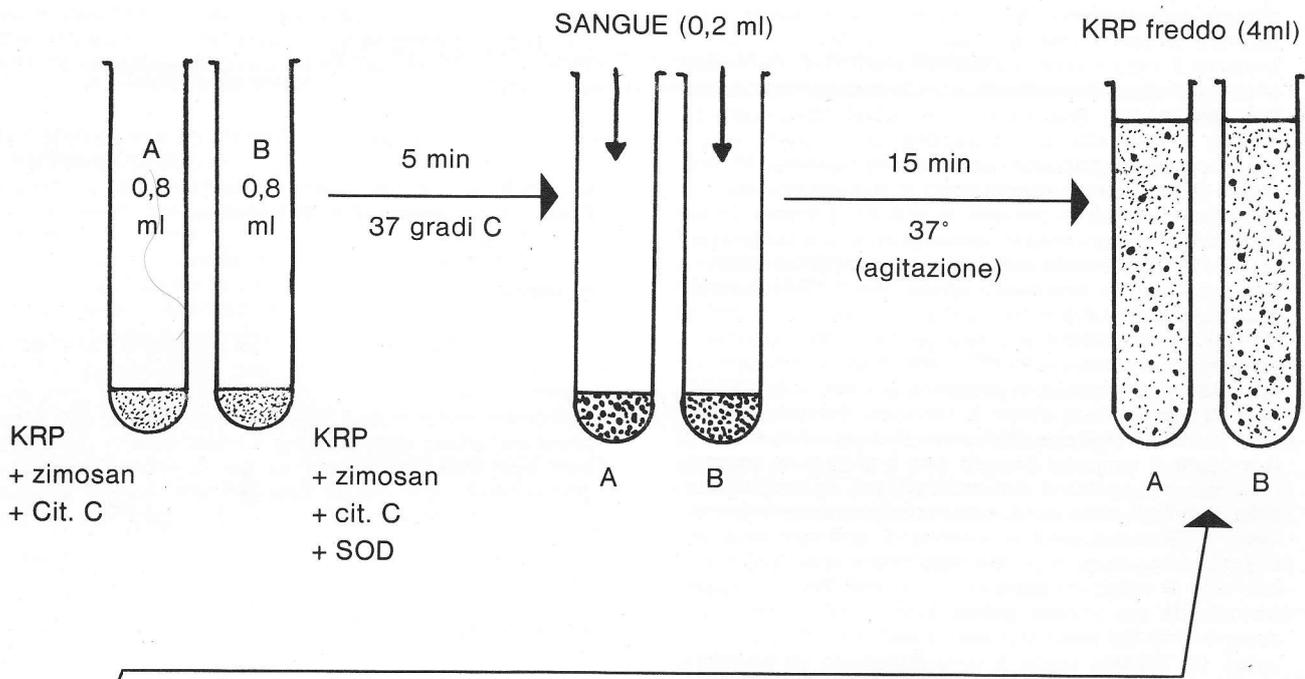
		Produzione di $O_2^-$ , % del controllo		
		I difetto cellulare	II difetto umorale	III difetto cellulare e umorale
GRANULOCITI DEL CONTROLLO	Stimolati con zimosan opsonizzato con plasma del controllo	100	100	100
	Stimolati con zimosan opsonizzato con plasma del paziente	80-100	0-40	0-40
GRANULOCITI DEL PAZIENTE	Stimolati con zimosan opsonizzato con plasma del controllo	0-40	80-100	0-40
	Stimolati con zimosan opsonizzato con plasma del paziente	0-40	0-40	0-40

Tab. II

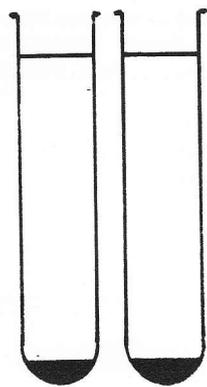
Produzione di superossido anione ( $O_2^-$ ) da parte di sangue umano di soggetti normali e di soggetti affetti da varia patologia.

	$O_2^-$ prodotto nmoli/15'/10 <sup>6</sup> granulociti		
	senza zimosan	con zimosan	natura del difetto *
53 maschi	2,5 ± 1,7 DS	83,3 ± 18,7 DS	-
Soggetti normali			
25 femmine	2,4 ± 1,5 DS	83,6 ± 17,8 DS	-
D.M. (maschio normale)	0,5	7,5	umorale
A.V. (maschio normale)	2,2	19,0	umorale
G.T. (maschio normale)	-	9,1	umorale
A.Z. (maschio, C.G.D.)	0	0,07	cellulare
F.S. (maschio, C.G.D.)	0	0,6	cellulare
A.G. (maschio, C.G.D.)	0,1	0	cellulare
C.F. (maschio, C.G.D.)	0	0,4	cellulare
M.M. (madre di A.G.)	2,7	25,1	cellulare
B.O. (madre di C.F.)	3,8	16,8	cellulare
G.Z. (madre di A.Z.)	1,5	59,3	cellulare ?
S.S. (Leucemia mielobl. ac.)	0,2	1,8	cellulare
D.P.V. (Leucemia mielobl. ac.)	0,2	7,3	cellulare
C.B. (deficit di C4)	0,8	2,8	umorale
S.R. (osteomielite staph.)	1,7	14,2	umorale
S.R. (dopo guarigione)	3,5	69,6	-

\* La natura del difetto è stata determinata mediante il «test in due fasi» descritto nel testo.



centrifugazione  
10' a 1500 x g



Misura della D.O. a 550 e 468 nm dei supernatanti  
La differenza di D.O. fra 550 e 468 nm di B viene sottratta a quella di A ( $\Delta$  O.D.)

$$\Delta \text{O.D.} \times \frac{5 \text{ (fattore di diluzione)}}{0,0245 \text{ } (\epsilon \mu\text{M del cit. C)}} = \text{O}_2 \text{ prodotto}$$

(nmoli/15'/0,2 ml di sangue)

A B

**LEGENDA :** KRP: soluzione di KREBS-RINGER fosfato pH 7,4 contenente 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM di glucosio.  
cit. C: citocromo C (tipo VI Sigma)  
SOD: superossido dismutasi.

zimosan opsonizzato con il plasma del paziente. I dettagli di questo «test in due fasi», comprese le condizioni ottimali di opsonizzazione sono descritti in (1) e (2).

Abbiamo recentemente introdotto una modifica migliorativa del test base descritto nella Figura 1 che permette di dedurre indirettamente la natura del difetto, senza dover ricorrere all'esecuzione del «test in due fasi». Si tratta di eseguire il saggio oltre che con zimosan non opsonizzato anche con uno stimolante solubile del metabolismo ossidativo dei fagociti (noi usiamo il forbolo-12-miristato-13-acetato (PMA) alla concentrazione di 1 µg/ml e con zimosan opsonizzato con siero umano normale. Avremo quindi 6 provette: due contenenti 1 mg di zimosan non opsonizzato (sono le provette A e B della Figura 1) due contenenti 1 mg di zimosan opsonizzato e due contenenti 1 µg di PMA. In questo caso, in presenza di un difetto a livello cellulare, si avrà bassa produzione di  $O_2^-$  da parte dei granulociti del sangue del paziente con tutti e tre gli stimolanti usati; mentre, in presenza di un difetto umorale si avrà bassa produzione di  $O_2^-$  in presenza di zimosan non opsonizzato e normale in presenza di PMA e di zimosan opsonizzato.

Con queste metodiche, abbiamo studiato la funzionalità fagocitaria di numerosi soggetti sani e di pazienti affetti da patologia per lo più di natura infettiva. I risultati, riportati nella Tabella II, dove sono inclusi per completezza anche i valori di  $O_2^-$  basali, cioè in assenza di zimosan, mostrano che fra i soggetti normali (sia maschi che femmine) c'è un intervallo di variabilità abbastanza ristretto. Tre dei soggetti normali, da noi studiati, presentavano una ridotta attività opsonizzante del plasma (il dato è stato ripetuto più di una volta). Un risultato simile è stato pubblicato da Soothill e Harvey (3) i quali hanno stimato che circa il 5% dei soggetti normali da loro studiati presentavano un deficit di opsonizzazione di natura ignota.

Praticamente assente è stata la produzione di  $O_2^-$  da parte dei granulociti del sangue di quattro pazienti con infezioni croniche gravi dimostratisi affetti da malattia granulomatosa cronica (CGD). Valori intermedi di  $O_2^-$  sono stati prodotti dai granulociti del sangue delle madri di tali pazienti, ciò essendo compatibile con la probabile ereditarietà recessiva legata al sesso di tale condizione (4). Il difetto di opsonizzazione nel paziente con deficienza di C4 rimane inspiegabile, se si tiene presente che lo zimosan attiva la via alternativa del complemento. Questo risultato, tuttavia, ha un

precedente: Klebanoff e Clark (5), infatti, hanno riscontrato una situazione analoga alla nostra in un paziente affetto da deficienza di C4.

In conclusione, riteniamo che questo test, per la felicità di esecuzione e per il tipo di informazioni che offre possa essere applicato su larga scala in tutte le condizioni in cui si sospetti una difettosa funzionalità fagocitaria sia primaria che acquisita (p. es. da farmaci o in concomitanza con altra patologia).

Finanziato con i contributi N° 79.03271.04 e N° 80.02387.04 del C.N.R. al prof. F. Rossi; con il contributo N° 80.00906.04 del C.N.R. e con un contributo dell'Università di Trieste (Fondo Incentivante) al prof. P. Patriarca.

## SUMMARY

*A test for the evaluation of the phagocytic function is presented. It is based on the measurement of the superoxide anion ( $O_2^-$ ) production by phagocytes stimulated with opsonized zymosan. The test is carried out with whole blood and allows distinguishing humoral defects (opsonization) from those dependent on the functional integrity of granulocytes. The results obtained with normal subjects and with patients affected by a variety of disorders are also reported.*

## BIBLIOGRAFIA

- 1) BELLAVITE P., DRI P., BERTON G. e ZABUCCHI G.  
Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ). I. Principi generali ed esecuzione. Lab. J. Res. Lab. Med. VII, 67, 1980.
- 2) BELLAVITE P., DRI P. e DELLA BIANCA V.:  
Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ). II. Condizioni di applicabilità e risultati ottenuti in casi patologici. LAB. J. Res. Lab. Med. VII, 77, 1980.
- 3) SOOTHILL J.F., and HARVEY A.M.:  
Defective opsonization. A common immunity deficiency. Arch. Dis. Child. 51, 91, 1976.
- 4) JOHNSTON R.B. and NEWMAN S.L.:  
Chronic granulomatous disease. Pediatrics Clinic of North America 24, 365, 1977.
- 5) KLEBANOFF S.J., and CLARK R.A.:  
Iodination by human polymorpho-nuclearleukocytes: A re-evaluation. J. Lab. Clin. Med. 89, 675, 1977.

# Deficit di IgA e di IgE ed infezioni respiratorie

The relationship of IgA and IgE deficiency and respiratory infections

M. B. Barbato, S. Lucarelli, A. Di Fazio, M. A. Schirru, L. Businco

la Clinica Pediatrica dell' Università di Roma - Centro di Allergia ed Immunologia Clinica (Direttore: Prof. E. Rezza)

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni alcuni Autori hanno studiato i rapporti esistenti tra deficit di IgA e livelli IgE allo scopo di chiarire se esistessero correlazioni tra le concentrazioni di queste immunoglobuline e la patologia infettiva.

I dati riferiti in letteratura su questo argomento sono contrastanti: mentre taluni Autori affermano che nei pazienti con deficit di IgA e di IgE c'è una maggiore incidenza di infezioni respiratorie (1-2-3-4), altri negano che le IgE svolgano un ruolo protettivo verso le infezioni nei pazienti con deficit di IgA (5-6-7-8-9-10-11).

Scopo del nostro studio è stato quello di approfondire ulteriormente le correlazioni esistenti tra deficit di IgA, livelli di IgE e patologia infettiva in pazienti con deficit di IgA e inoltre di studiare il comportamento delle IgE totali e specifiche nei pazienti con deficit di IgA che presentavano asma.

Dei 14 pazienti con infezione, inoltre, 3 soffrivano di asma. In tutti i soggetti sono stati dosati i valori di IgE totali e specifiche per il *Dermatophagoides Pteronissimus*, l'*Alternaria tenuis*, il *Lolium perenne*, il latte vaccino e l'uovo, con il metodo di Phadebas Prist e Phadebas Rast (12).

Nella figura 1 sono riportati i valori normali delle IgE ± 2DS ottenuti nel nostro laboratorio per le differenti classi di età.

Il dosaggio delle IgA seriche è stato eseguito con il metodo di Mancini e Carbonara (1965) su piastre Behringwerke-partigen LC che consentono dosaggi fino a 2 mg% (14).

In tutti i pazienti sottoposti al nostro studio i livelli delle IgA seriche non superavano i 4 mg% e le IgA secretorie erano assenti.

La diagnosi di immunodeficienza nei soggetti esaminati è stata fatta praticando vari test per lo studio dei linfociti T e B, come riferito in nostri precedenti lavori (15-16).

La significatività dei dati ottenuti è stata valutata con il Wilcoxon Rank Sum Test (two sided).

## MATERIALE E METODO

Il nostro studio è stato effettuato su 23 pazienti, 14 maschi e 9 femmine, di età compresa tra 4 mesi e 26 anni, di cui 7 affetti da difetto selettivo di IgA, 11 da Atassia-Telangectasia e 5 da immunodeficienza comune variabile con difetto di IgA.

Dei 23 soggetti 14 presentavano frequenti infezioni delle vie respiratorie sinusiti, bronchiti e polmoniti, in 4 erano presenti bronchiectasie diffuse i rimanenti 9 invece, non avevano mai sofferto di infezioni.

## RISULTATI

Nella figura sono riportati i valori di IgE totali nei pazienti sottoposti al nostro studio.

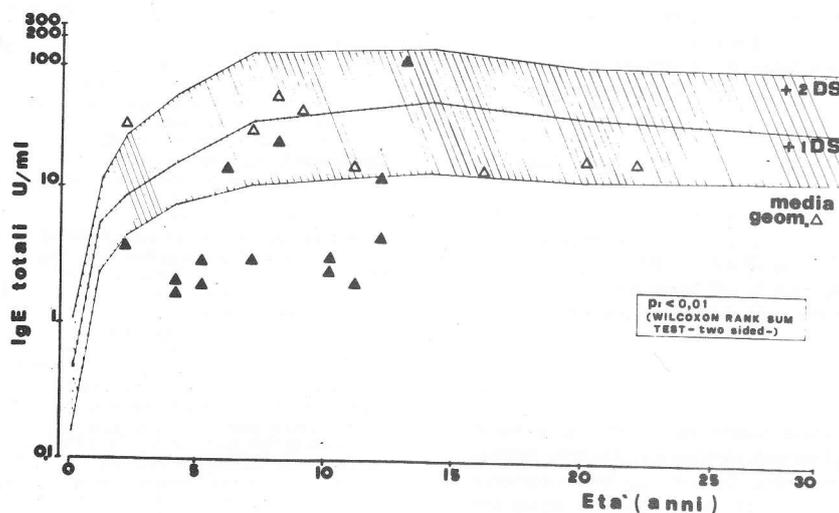
Come si può rilevare i 14 pazienti con infezioni respiratorie presentavano valori di IgE nei limiti della norma; tuttavia questi in 9 casi erano compresi tra -1DS e -2DS.

Dei 9 pazienti con deficit di IgA senza infezioni respiratorie solo in 1 i valori di IgE erano compresi tra la media e -1DS.

La differenza tra la media dei valori di IgE nei soggetti con infezioni e quella nei soggetti senza infezioni respiratorie è risultata altamente significativa (p. inf. a 0.01).

Nei 3 soggetti che soffrivano di asma e di infezioni il RAST è risultato negativo e i valori di IgE erano compresi tra -1DS e -2DS.

**IGE TOTALI IN PAZIENTI (n.23) AFFETTI DA DEFICIT DI IGA CON INFEZIONI RESPIRATORIE(▲) E SENZA INFEZIONI RESPIRATORIE(△)**



## CONCLUSIONI

I nostri dati confermano che nei pazienti con deficit di IgA e di IgE c'è una maggiore incidenza di infezioni respiratorie rispetto ai pazienti con solo deficit di IgA ( $p < 0,01$ ), in accordo con le precedenti osservazioni compiute da altri Autori in soggetti affetti da varie forme di immunodeficienza (1-2-3-4). Ciò suggerisce che le IgE oltre alla nota attività reaginica, possono svolgere anche un ruolo protettivo verso le infezioni respiratorie. Questa ipotesi è confermata anche da osservazioni compiute nelle parassitosi, in cui è ormai accertato da tutti il ruolo difensivo svolto da questi anticorpi (17-18-19-20-21) recentemente nella fase acuta della mononucleosi infettiva è stata messa in evidenza la comparsa di IgE specifiche verso il virus di Epstein-Barr (22). Gli Autori ritengono che questi anticorpi, attraverso la liberazione di mediatori solubili, svolgerebbero un ruolo protettivo stimolando l'immunità locale e generale durante la fase acuta dell'infezione. Infatti l'aumentata permeabilità versale, unitamente alla liberazione di fattori chemiotattici per i neutrofili e gli eosinofili, favorisce l'arrivo, nella sede del processo infettivo di fattori immunitari come anticorpi e cellule immunocompetenti, potenziando in questo modo la risposta dell'ospite verso l'agente infettivo (22).

È probabile che lo stesso meccanismo difensivo si verifichi anche in svariate infezioni virali, come quella sostenuta dal citomegalovirus e forse anche in altre in cui è stato documentato un aumento di anticorpi IgE durante la fase acuta (23-24).

Un altro dato interessante che risulta dal nostro lavoro è che i 3 pazienti con asma erano cuti e Rast negativi. Questo dato suggerisce che in questi pazienti l'asma può essere di origine cosiddetta intrinseca ed in particolare potrebbe essere favorita dalle infezioni stesse.

In conclusione le osservazioni compiute i pazienti affetti da immunodeficienze primitive ha permesso negli ultimi anni di chiarire meglio la funzione del sistema immunitario. Anche i risultati del presente studio portano un ulteriore piccolo contributo in favore del ruolo difensivo svolto dagli anticorpi di tipo IgE.

## RIASSUNTO

Sono state dosate le IgE totali e specifiche in 23 pazienti, di età compresa tra 4 mesi e 26 anni, affetti da deficit selettivo di IgA; in 7 il difetto di IgA era isolato, in 11 era associato ad atassia teleangectasica e in 5 ad immunodeficienza comune variabile. Il fine era quello di studiare le correlazioni esistenti tra deficit di IgA, livelli di IgE e patologia infettiva.

Dei 23 soggetti 14 presentavano frequenti batteriche delle vie respiratorie: sinusiti, bronchiti e polmoniti.

I 14 pazienti con infezioni respiratorie presentavano valori di IgE nei limiti della norma; tuttavia in 9 erano compresi tra -1DS e -2DS.

Dei 9 pazienti con deficit di IgA senza infezioni respiratorie solo in uno i valori di IgE erano compresi tra la media e -1DS.

La differenza tra la media dei valori di IgE nei soggetti con infezioni e quella nei soggetti senza infezioni respiratorie è risultata altamente significativa ( $P$  inf. a 0.01).

Questi dati suggeriscono che le IgE oltre alla nota attività reaginica possano svolgere anche un ruolo protettivo verso le infezioni.

## SUMMARY

In the present study we have examined serum IgE levels in 23 patients 7 with selective IgA deficiency, 11 with Ataxia-Teleangectasia and IgA deficit 5, with common variable hypogammaglobulinemia and IgA deficit, to investigate the

relationship between IgA deficiency, IgE levels and infections. 14 of 23 patients had high incidence of sinupulmonary infections and 9 had not recurrent infections. In the 14 patients with recurrent infections serum IgE levels were normal for their age, but in 9 were between -1DS and -2DS.

In the 9 patients with IgA deficit without respiratory infections serum IgE levels were normal, only in 1 they were between the geometric average and -1DS.

In the subjects with recurrent infections the mean of IgE was significantly lower than that in the patients with IgA deficit without infections ( $p < 0.01$ ).

These results suggest that the association of IgE and IgA deficiency seems to predispose to recurrent infections.

Questo lavoro è stato eseguito con un contributo del C.N.R.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Amman A.J., Cain W.A., Ishizaka K., Hong R., Good R.A.: Immunoglobulin E deficiency in Ataxia-Telangectasia. *N. Engl. J. Med.* 281, 469, 1969 a.
- 2) Amman A.J., Good R.A., Bier D., Fudenberg H.H.: Long-term plasma infusions in a patient with Ataxia-Telangectasia and deficient IgA and IgE. *Pediatrics* 44, 672, 1969 b.
- 3) Amman A.J., Roth J., Hong R.: Recurrent sinupulmonary infections, mental retardation and combined IgA and IgE deficiency. *J. Pediat.* 77, 802, 1970.
- 4) Cain W.A., Amman A.J., Hong R., Ishizaka K., Good R.A.: IgE deficiency associated with chronic sinupulmonary infection. *J. Clin. Invest.* 48, 12 A, 1969.
- 5) Biggar D., Lapointe M., Ishizaka K., Meuwissen H.J., Good R.A.: IgE in Ataxia-Telangectasia and family members. *Lancet*, ii, 1089, 1970.
- 6) Schwartz D.P., Buckley R.H.: Serum IgE concentrations and skin reactivity to anti-IgE antibody in IgA-deficient patients. *N. Engl. J. Med.* 284, 513, 1971.
- 7) Good R.A., Choi Y.S.: Relation of IgA and IgE to bodily defenses. *N. Engl. J. Med.* 284, 552, 1971.
- 8) Collins-Williams C., Chiu A.W., Varga E.A.: The relationship of atopic disease and immunoglobulin levels with special reference to selective IgA deficiency. *Clin. All.* 1, 381, 1971.
- 9) Polmar S.H., Waldmann T.A., Balestra S.T., Jost M.C., Terry W.D.: Relation of IgA and IgE to respiratory tract disease in isolated IgE deficiency, IgA deficiency and Ataxia-Telangectasia. *J. of Clin. Invest.* 51, 326, 1972.
- 10) Polmar S.H., Waldmann T.A., Terry W.D.: The relationship of IgA and IgE deficiency. *Birth defects. Original article series*, Vol. XI, N° 1, pag. 147, 1975.
- 11) Stites D.P., Ishizaka K., Fudenberg H.H.: The relationship of IgA and IgE deficiency. *Birth defects. Original Article Series*. Vol. XI, N° 1, pag. 151, 1975.
- 12) Berg T., Johansson S.G.O.: IgE concentrations in children with atopic disease. A clinical study. *Int. Arch. Allergy* 36, 219, 1969.
- 13) Foucard T., Johansson S.G.O., Bennich H., Berg T.: In vitro estimation of allergens by a radioimmune antiglobulin technique using human IgE antibodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 43, 360, 1972.
- 14) Mancini G., Carbonara A., Heremans G.F.: Immunochemical quantitation of antigen by single immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235, 1965.
- 15) Aiuti F., Businco L., Gatti R.A.: Recostitution of T cell disorders following thymus transplantation. *Birth defects. Original Article Series* pag. 370, 1975.
- 16) Businco L., Rezza E., Giunchi G., Aiuti F.: Thymus transplantation: recostitution of cellular immunity in a four-year-old patient with T-cell deficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 21, 32, 1975.
- 22) Bahma S.L., Horwitz C.A., Fiala M., Heiner D.C.: IgE response in heterophil-positive infectious mononucleosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 167, 1978.
- 23) Bahma S.L., Horwitz C.A., Heiner D.C.: IgE in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 177, 1978.
- 24) Perelmutter L., Phipps P., Potvin L.: The role of viral and bacterial infections in modulating IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61, 177, 1978.

# L'attivazione della via alternativa del complemento nella M. di Schonlein - Henoch dell'infanzia

*Activation of alternative complement pathway in children Schonlein Henoch purpura*

M. Rossitto, S. Bidoglio, P. Cantone, M. Bardare  
Clinica Pediatrica dell' Università di Milano

L'attivazione del complemento può avvenire attraverso due vie: la via classica e la via alternativa.

Nella via classica l'attivazione del complemento avviene per mezzo della sua frazione C1q, che prende il primo contatto con la porzione Fc delle immunoglobuline; contemporaneamente, attraverso C1r, viene attivata la esterasi C1s, che agisce su C4 e su C2 dando luogo alla C3 convertasi C4,2, che scinde il C3 in C3a e C3b.

La via classica è attivata dagli anticorpi della classe IgG 1-2-3, ed ancor più dalle IgM.

Nella via alternativa il clivaggio di C3 con formazione di C3b, avviene per l'interazione continua e con bassa velocità di reazione, di C3, Fattore B, Fattore D e Properdina; C3B INA e Beta 1H sono proteine che regolano questa interazione (3).

Le sostanze attivatrici della via alternativa (zymosan, inulina, IgA, lipopolisaccaridi ed endotossine batteriche) agiscono bloccando queste proteine (meccanismo di deregolazione) (7).

L'attivazione della via alternativa è quindi un importante meccanismo di difesa antibatterica che potremmo definire in «prima linea», mentre la attivazione della via classica avviene solo in un secondo tempo, quando si sono già formati gli anticorpi antibatterici. Oltre a questa funzione eminentemente di difesa, l'attivazione della via alternativa può, in determinati stati morbosi, mediare il danno: è quanto probabilmente si verifica nella s. di Berger e nella s. di Schonlein-Henoch, così come in altre vasculiti, ad esempio nella artrite reumatoide (1).

In questo studio abbiamo esaminato il profilo complementemico e l'attivazione della via alternativa in un gruppo di pazienti affetti da porpora di Schonlein - Henoch.

## CASISTICA

Si sono presi in considerazione 18 pazienti di età compresa tra i 3 e i 10 anni, 9 maschi e 9 femmine, ricoverati nella Clinica Pediatrica dell'Università di Milano, nel periodo 1978/80, per malattia di Schonlein - Henoch.

La diagnosi è stata posta in base alla sintomatologia clinica (sono stati esclusi i casi per i quali potevano sussistere dubbi diagnostici) ed i prelievi sono stati effettuati sempre in fase di attività della malattia e preferibilmente quando i soggetti non erano sottoposti ad alcuna terapia. In tutti i casi sono stati eseguiti i seguenti esami:

- dosaggio Ig seriche
- dosaggio immunochimico di C3 e C4
- dosaggio attività emolitica totale del complemento (CH50)
- dosaggio attività emolitica del siero mediante attivazione della via alternativa del complemento
- criocrito.

## MATERIALI E METODI

I sieri per i diversi esami sono stati conservati per un periodo non superiore ai 30 giorni alla temperatura di -70° C.

Per il dosaggio di immunoglobuline e C3 - C4 si è utilizzata l'immunodiffusione radiale secondo Mancini (6), per l'attività emolitica totale del complemento il metodo di Kabet e Mayer (4); la metodica per l'attivazione della via alternativa è una modificazione del metodo originale di Platts - Mills ed Ishizaka (8) e viene qui descritta in breve.

Emazie di cavia all'1% ripetutamente lavate, sono aggiunte, nella quantità di 100 microlitri, a diluizioni scalari del siero in esame con PBS-EDTA-MgCl 0,01 M. Si aggiungono poi 20 microlitri di inulina; le provette vengono tenute in bagno per 1 ora a 37°; si uniscono 2 ml di PBS-EDTA fredda per ogni provetta; dopo centrifugazione, si legge la D.O. allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 415 mm.

Il risultato si esprime in unità emolitiche ed è rappresentato dal valore pari al 50% della lisi (UCH50/ml).

Ovviamente per ogni serie di esami è necessario testare un controllo costituito da un pool di sieri normali, a causa della diversa sensibilità delle emazie alla lisi (soprattutto in rapporto alla durata della conservazione).

## RISULTATI

I risultati sono riassunti nella tabella I e nei grafici A e B. Mancano nella tabella i dati riguardanti la ricerca delle crioglobuline, che sono risultate sempre negative. Si può notare che i livelli serici di IgA si sono dimostrati superiori al controllo normali per l'età in 14 su 18 casi, i valori di CH50 sono risultati tutti superiori a quelli di C3 e C4 normali o superiori.

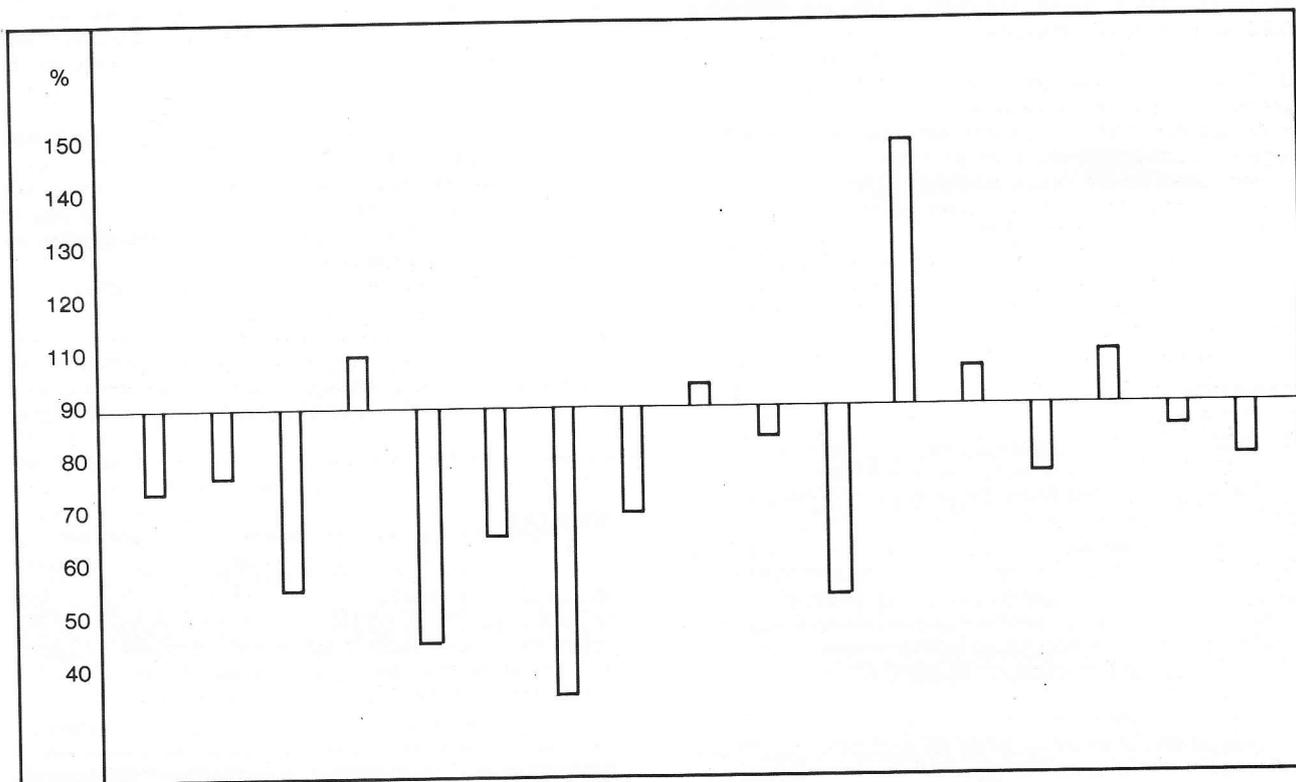
Per quanto riguarda l'attivazione della via alternativa, si sono espressi i valori ottenuti in percentuale del controllo normale: 10 su 18 casi sono risultati inferiori al 90% dei valori di controllo.

## TAVOLA I

PAZIENTI	IgA mg%	IgM mg%	IgG mg%	C <sub>3</sub> mg%	C <sub>4</sub> mg%	CH <sub>50</sub> U/ml	
1	275	340	1220	111	70	1332	(930)
2	220	160	1400	98	53	1739	(1176)
3	150	144	1040	89	66	832	(816)
4	153	98	1100	98	70	1776	(1142)
5	268	142	1100	100	60	1500	(1100)
6	167	320	2700	111	70	1600	(1176)
7	295	220	1780	98	68	1818	(1142)
8	245	135	1850	126	60	1818	(1142)
9	242	72	1083	116	38		
10	81	141	824	137	50	1300	(1176)
11	212	114	1006	131	26	1666	(1176)
12	690	186	2000			2000	(1290)
13	163	279	1162	191	54	1481	(930)
14	191	44	592	111	48	1052	(930)
15	265	121	1546	157	64	1250	(1176)
16	198	176	1224	121		1480	(1428)
17	126	148	1327	98			
18	219	60	1203	85	56	1250	(1333)

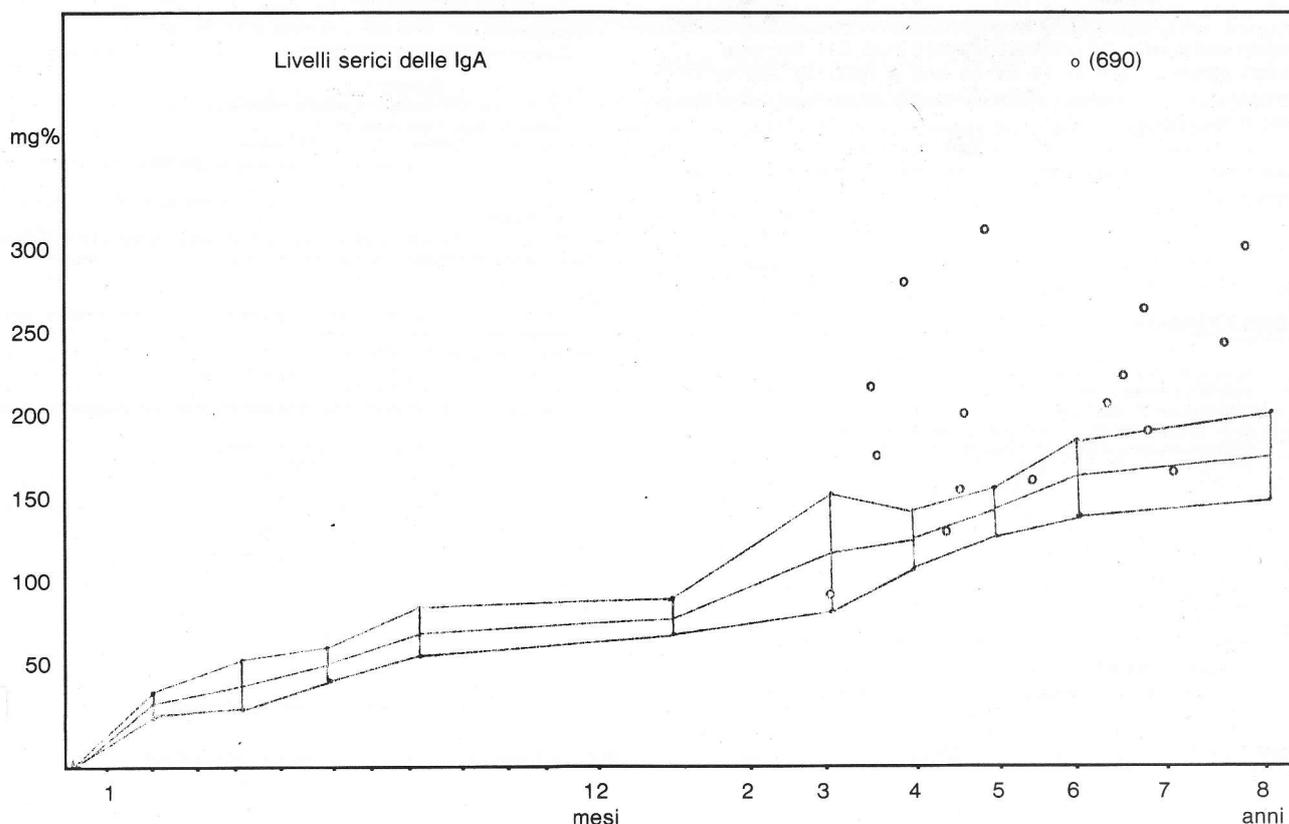
I valori indicati tra parentesi si riferiscono ai controlli normali intra-test.

Grafico A - Rappresentazione grafica dei valori di attivazione della via alternativa del complemento.



NOTA - Il valore 100% corrisponde ai controlli normali

Grafico B



#### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'attivazione della via alternativa è diminuita, come si vede dai risultati, nel 55% della nostra casistica.

Nell'interpretazione dei dati si possono considerare le seguenti ipotesi:

- diminuita sintesi dei fattori complementari,
- accresciuto consumo degli stessi,
- deficit funzionale di tutta la via.

Una risposta definitiva a questi quesiti potrebbe essere data effettuando il dosaggio dei singoli fattori (mediante metodi immunologici o emolitici), oppure studiandone il turn-over con l'introduzione di fattori marcati (10).

Ad ogni modo sembrerebbe ragionevole interpretare questi dati come indice di aumento consumo, per almeno due considerazioni:

- deficit genetici dei singoli fattori della via alternativa non sono stati chiaramente descritti in letteratura;
- deficit funzionali della via alternativa si esprimono, sul piano clinico, con ricorrenti episodi infettivi, il che non trova riscontro nel gruppo di pazienti considerato.

In questi soggetti potrebbe allora verificarsi un aumento consumo della via alternativa del complemento in concomitanza con le manifestazioni cliniche della porpora anafilatoide, mentre la via classica non appare interessata, sia perchè i valori di CH50 non indicano un aumentato consumo, sia per la normalità di C3 e C4 serici.

I fattori responsabili della esaltata attivazione della via alternativa potrebbero essere le IgA, che anche nella nostra casistica sono risultate spesso aumentate, anche se non abbiamo potuto stabilire una correlazione tra attivazione della via alternativa ed aumento delle IgA.

Gli aggregati di IgA si sono dimostrati attivatori della via alternativa (5,9). Nella porpora di Schonlein-Henoch le IgA sono presenti negli immunocomplessi circolanti e nelle crioglobuline, laddove queste sono state dimostrate (2).

Una volta attivato, il sistema complementare può esplicare un effetto patologico tramite gli elementi cellulari dell'infiammazione e precisamente attraverso:

- l'aumentata permeabilità vascolare locale, per esaltata liberazione di istamina e sostanze istamino-simili da parte delle mastcellule, mediata da C3a e C5a;
- l'attivazione chemiotattica da parte di C5a sui leucociti e loro legame con C3b, che determina un aumento della loro funzione fagocitaria e secretoria di enzimi lisosomiali.

Con tale meccanismo potrebbero essere giustificate le lesioni cutanee come le lesioni renali, la compromissione articolare come l'interessamento dell'apparato gastro-intestinale.

Queste considerazioni hanno un valore puramente ipotetico non potendosi trarre delle conclusioni definitive dalla casistica, numericamente limitata, che è stata qui riportata. L'allargamento delle indagini ad un numero più vasto di pazienti, un controllo nel tempo del profilo complementemico (è infatti presumibile che l'attivazione della via alternativa ritorni alla norma dopo la guarigione), potrebbero fornire ulteriori acquisizioni sulla malattia di Schonlein-Henoch.

**SUMMARY**

*Ig, C3, C4, CH50 and alternative complement pathway have been assayed in 18 children affected from S.H. purpura. High levels of IgA in 14 cases and a reduced activity of alternative complement pathway in 10 cases have been the main results of this study. It could be suggested that IgA complexes activate the alternative pathway which then mediates the vascular lesions.*

**BIBLIOGRAFIA**

- 1) EL-GHOBAREY A.F., WHALEY K.:  
Alternative Pathway of complement activation in rheumatoid arthritis.  
J. Rheumatol. 7, 453, 1980.
- 2) GARCIA-FUENTES M., CHANTLER C., GWYN WILLIAMS D.:  
Cryoglobulinaemia in Henoch-Schoenlein purpura.  
Brit. Med. J. 2, 163 - 165, 1977.

- 3) KAZATCHKINE M.D., NYDEGGER U., FEARON D.I.:  
La voie alterne du complement.  
Nouv. Presse Med. 8, 2187 - 2194, 1979.
- 4) LACHMANN P.J., HOBART M., ASTON W.:  
Complement Tecnology in «Handbook of Experimental immunology».  
Cap. 5, 12 - 13, 1973.
- 5) LEVINSKY O.J., BARRAT T.M.:  
IgA immune-complexes in Schoenlein-Henoch purpura.  
Lancet. 24 Nov. 1100-1103, 1979.
- 6) MANCINI G., CARBONARA O., HEREMANS J.F.:  
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.  
Immunochemistry, 2, 235, 1965.
- 7) PANGBURN M.K., MORRISON P.C., SCHREIBER R.D., MULLER-  
EBERHARD H.J.:  
Activation of the alternative complement pathway: recognition of surface  
structures on activators by bound C3b.  
J. Immunol. 124, 977 - 982, 1980.
- 8) PLATTS-MILLS T.A.E., ISHIZAKA K.:  
Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells.  
J. Immunol. 113, 348 - 358, 1974.
- 9) TRYGSTAD C.W., STIEMME R.:  
Elevated serum IgA globulin in anaphylactoid purpura.  
Pediatrics 47, 1023 - 1030, 1971.
- 10) WILSON M.R., ARROYAVE C.M., NAKAMURA R.M., VAUGHAN J.H., TAN  
E.M.:  
Activation of the alternative complement pathway in SLE.  
Clin. Exp. Immunol. 26, 11 - 20, 1976.

## L' interferon in malattie autoimmuni : un nuovo marker biologico ?

*Interferon in autoimmune diseases : a new biologic marker ?*

P. A. Tovo, A. Pugliese, E. Palomba, M. Beatrice, V. Cagliero, P. Cosseta, A. Delpiano

Clinica Pediatrica II, Università degli studi di Torino - Istituto di Microbiologia, Università degli studi di Torino

Molte condizioni morbose ad etiopatogenesi oscura vengono oggi etichettate come dovute a fenomeni autoaggressivi. Più dati laboratoristici ed indagini sperimentali suffragano, almeno per alcune, quest'ipotesi. In questi pazienti le ricerche si sono soprattutto focalizzate sull'andamento dei parametri immunologici. I risultati emersi da questi studi, oltre a confermare o confutare la validità di alcune teorie, hanno spesso permesso di identificare utili «markers» diagnostici nonché validi indici della attività della malattia, utilizzabili, talora, anche a fini terapeutici.

Recentemente Hooks e coll. (1) hanno osservato che pazienti con artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerodermia e lupus eritematoso sistemico (LES) hanno in circolo livelli significativi di interferon (IF) acido-labile con una frequenza superiore a quella dei soggetti di controllo. Nel caso del LES gli stessi Autori (1) hanno rilevato che tale parametro sembra correlarsi con l'attività della malattia. Questi dati appaiono particolarmente interessanti se si tiene conto che, anche se esistono dubbi in proposito (2), l'acidolabilità è considerata una caratteristica dell'IF di tipo II o immune, rilasciato, come altre linfochine, durante la risposta adattiva cellulo-mediata, mentre l'IF di tipo I o standard, indotto da virus o sostanze sintetiche (3,4), appare acidoresistente.

Al fine di verificare ed estendere queste osservazioni, abbiamo intrapreso uno studio su pazienti di età pediatrica affetti da varie forme di malattie a supposta origine autoimmune.

In questa sede riportiamo i dati preliminari di questa indagine.

### CASISTICA E METODICHE

Sono stati sinora analizzati 117 campioni di siero, ottenuti da 6 pazienti con artrite reumatoide, 52 con diabete giovanile, 14 con diabete senile, 4 con sindrome di Schönlein-Henoch, 5 con endocrinopatie, 12 con piastrinopenia e 24 bambini di controllo.

I sieri sono stati congelati a 20°C e poi titolati per l'eventuale presenza di IF secondo la metodica di Ole e coll. (6). In breve, ogni siero viene diluito in ragione di 2 a partire dalla diluizione di 1:4 0,5 ml di ogni diluizione vengono incubati per una notte a 37°C con colture di cellule WISH, monostratificate su piastre Makroplatten da 24 pozzetti, usando come terreno di coltura RPMI (GIBCO) e 10% di FCS. L'indomani le cellule sono lavate tre volte con il terreno di coltura privo di FCS e quindi cimentate con virus Sindbis ad una molteplicità di 20:1. Dopo 20 ore di incubazione a 37°C, le cellule vengono congelate e scongelate per liberare anche il virus intracellulare. Il virus sviluppatosi viene titolato valutando la sua capacità di emoagglutinare emazie di oca. Il titolo di IF è espresso dalla più alta diluizione di siero ancora in grado di inibire del 75% il titolo emoagglutinante del virus cimentate rispetto al controllo. In caso di presenza di valori di IF > 4 U.I./ml, la frazione acidolabile viene valutata con la stessa metodica, dopo acidificazione del siero a pH 2 per 2 ore.

### RISULTATI

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella n. 1 e dimostrano che nessuno dei soggetti di controllo ha valori di IF circolante superiori a 4 U.I./ml.

Lo stesso si osserva nei pazienti con piastrinopenia e diabete senile.

Per contro 3/6 (50%) dei pazienti con artrite reumatoide, 2/5 (40%) con endocrinopatie, 1/4 (25%) con sindrome di Schönlein-Henoch e 27/52 (52%) con diabete giovanile mostrano valori di IF > 4 U.I./ml. In tutti questi casi, dopo acidificazione dei campioni di siero a pH 2 per 2 ore, l'IF si è costantemente ridotto a valori ≤ 4 U.I./ml.

**LIVELLI DI IF CIRCOLANTI IN PAZIENTI CON VARIE MALATTIE A SUPPOSTA ORIGINE AUTOIMMUNE ED IN BAMBINI DI CONTROLLO**

IF (U.I./ml)	< 4	4	8	16
Normali	17	7	-	-
Artrite Reumatoide	2	1	3	-
Schönlein-Henoch	3	-	-	1
Endocrinopatie	2	1	2	-
Piastrinopenie	11	1	-	-
Diabete giovanile	14	11	21	6
Diabete senile	12	2	-	-

### DISCUSSIONE

I nostri risultati confermano che alcuni pazienti affetti da malattie a provata o supposta origine autoimmune hanno livelli dosabili di IF acido-labile in circolo.

Data la casistica ancora limitata i dati rimangono puramente indicativi per alcune forme, mentre per altre il riscontro pare già significativo.

La causa della iperproduzione di IF ed il suo ruolo nelle malattie autoimmuni rimane sconosciuto. L'IF di tipo II potrebbe essere prodotto e dismesso in circolo come altre interleuchine originatesi durante reazioni immunologiche (3,4). Non può tuttavia essere scartata l'ipotesi di Skurkovich (7) secondo la quale, poiché la sintesi di IF viene indotta tramite la derepressione di uno o più geni, vari fattori (virus, batteri, tossine, farmaci, costituzione

genetica ecc.) riconosciuti in grado di determinare la comparsa di autoantigeni o di ridurre la tolleranza immunologica, potrebbero primariamente od in parallelo interferire sui geni che ne regolano la produzione.

L'alterato meccanismo repressivo determinerebbe un aumento persistente della sintesi di IF.

Indipendentemente dal meccanismo responsabile della sua iperproduzione, l'IF può concorrere in più modi allo scatenamento e/o al mantenimento di fenomeni autoaggressivi. Accumulandosi sulla superficie cellulare è in grado di facilitare l'espressione di antigeni di membrana (8,9) e di aumentare la sensibilità anche di antigeni deboli veso anticorpi specifici (5). L'IF presente in circolo potenzia l'attività delle cellule citotossiche (10,11) e favorisce la reattività delle cellule immunocompetenti (12). D'altra parte autoantigeni e complessi autoimmuni favoriscono la produzione di IF (5,13). In quest'ottica va sottolineato che, a parità di effetto antivirale, l'IF immune è da 100 a 1000 volte più attivo di quello classico nel determinare gli effetti ricordati (8,11). Infine è stato osservato che l'IF favorisce l'evoluzione della malattia autoimmune che colpisce i topi NZB (14) e può indurre una glomerulonefrite da immunocomplessi in topi neonati (15).

Anche se il suo ruolo biologico rimane da definire, la presenza in circolo di IF acido-labile in forme autoimmuni può costituire un nuovo «marker» in grado di meglio definire o dimostrare l'origine autoimmune di varie condizioni morbose.

Particolarmente interessante in proposito ci pare il suo riscontro con pazienti con diabete insulino-dipendente.

Rimane infine da chiarire se, nell'ambito di uno stesso gruppo di pazienti, la presenza di IF sia una caratteristica evidenziabile in modo costante solo in alcuni o non compaia piuttosto in modo saltuario in tutti. Queste indagini longitudinali, attualmente in corso, potranno inoltre verificare se, come osservato nel LES da Hooks e coll. (1), la presenza di IF circolante costituisca un indice di attività della malattia.

#### SUMMARY

*Immune interferon has been assayed on sera of patients affected by rheumatoid arthritis, juvenile diabetes, Schonlein Henoch purpura, thrombocyto-penia; results have been compared with the ones of a series of controls. In control sera immune IF never exceeded 4 U.I./ml while 50% of patients with R.A., 25% of the ones with S.H. purpura and 52% of the cases with juvenile diabetes were in the range over 4 U.I./ml. In all cases IF activity fell below 4 U.I./ml in acid medium.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. HOOKS J.J., MOUTSOPOULOS H.M., GEIS S.A., STAHL N.I., DECKER J.L., NOTKINS A.L.: Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. N. Engl. J. Med. 301, 5, 1979.
2. PUGLIESE A., TOVO P.A.: Are thermostability and acid-lability characteristics of immune interferon in mice? Immunol. Letters (in stampa).
3. JOHNSON H.M., STANTON J.G., BARON S.: Relative ability of mitogens to stimulate production of interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the in vitro immune response. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 138, 1977.
4. SONNEFELD G., SALVIN S.B., YOUNGER J.S.: Cellular source of interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. Infect. Immun. 17, 639, 1977.
5. SONNEFELD G., MERIGAN T.C.: A regulatory role for interferon in immunity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 332, 345, 1979.
6. OIE H.K., BUKLER C.E., UHLENDORF C.P., HILL D.A., BARON S.: Improved assays for a variety of interferon. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 1178, 1972.
7. SKURKOWICH S.V.: The probable role of interferon in autoimmune and allergic diseases: Interferon Scientific Memoranda. Aprile, 1980.
8. LINHAL P., FRESSER I., LEARY P., ROVERY M.: Interferon treatment of mice: Enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 1284, 1976.
9. VIGNAUX F., GRESSER I.: Differenzial effects of interferon on the expression of H-2K, H-2D and Ia antigens on mouse lymphocytes. J. Immunol. 118, 721, 1977.
10. SANTOLI D., TRINCHIERI G., KOPROWSKI H.: Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. Immunol. 12, 532, 1978.
11. SIMON P.L., FARRAR J.J., KIND P.D.: Biochemical relationship between murine immune interferon and a killer cell helper factor. J. Immunol. 122, 127, 1979.
12. SONNEFELD G., MANDEL A.D., MERIGAN T.C.: Time and dosage dependence of immunoenhancement by murine type II interferon preparations. Cell. Immunol. 40, 285, 1978.
13. FUJIBAYASHI T., HOOKS J.J., NOTKINS A.L.: Production of interferon by immune lymphocytes exposed to herpes simplex virus-antibody complexes. J. Immunol. 115, 1191, 1975.
14. HEREMANS H., BILLIAN A., COLOMBATTI A., HILGERS J., DE SOMER P.: Interferon treatment of NZB mice: Accelerated Progression of Autoimmune Disease. Infect. Immun. 21, 925, 1978.
15. GRESSER I., MONRY C., TOVEY M.: Progressive glomerulonephritis in mice treated with interferon preparations at birth. Nature 263, 420, 1976.

## Effetto stimolante «in vitro» del Metisoprinolo sulle null cells (T) di $\beta$ - Talassemici Major

*In vitro stimulant effect of metisoprinol on T null cells of patient with  $\beta$  thalassemia Major*

D. De Mattia, A. Mautone, M. Altomare, L. Rizzo, O. Montagna

Istituto di Puericoltura dell' Università di Bari

Il Metisoprinolo, un complesso di inosina e di p-acetamidobenzoato di 1- (dimetilamino -2- propanolo) nel rapporto di 1:3, interferisce con la risposta immunitaria sia a livello umorale (aumento del titolo di anticorpi neutralizzanti in infezioni virali sperimentali o dopo vaccinazioni antivirali) (1) sia a livello cellulare (2). Il Metisoprinolo, infatti, aumenta la blastizzazione da fitoemoagglutinina e da concanavalina A dei linfociti umani «in vitro» ed inoltre influenza positivamente il test delle colture miste linfocitarie (MCL) (1,2).

In questa ricerca abbiamo saggiato «in vitro» l'attività immunostimolante del Metisoprinolo partendo da una condizione clinica nella quale vi era un deficit accertato di linfociti T. Da nostre precedenti ricerche (3) ed in contemporanei studi di Musumeci e Coll. (4) era stata evidenziata una ridotta presenza di linfociti T (linfociti formanti rosette E), sia per valore percentuale che per valore assoluto, nei bambini affetti da  $\beta$ -talassemia major politrasfusi, anche se splenectomizzati, ed un aumento relativo delle «null cells», in quanto i linfociti B erano uguali per numero e percentuale ai controlli (3,4). Abbiamo perciò ritenuto interessante il poter valutare l'effetto del metisoprinolo sulla potenzialità delle «null cells» di tali soggetti in senso T linfocitario.

### MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta su linfociti provenienti da 17 bambini affetti da  $\beta$ -talassemia major, politrasfusi, di età compresa fra 4 e 14 anni, di cui 5 splenectomizzati.

Il sangue è stato prelevato per venopuntura con siringhe di plastica almeno 20 giorni dopo la trasfusione e raccolto in provette sterili graduate con eparina liofilizzata (Vister) nel rapporto di 1 mg/5 ml. Le rosette E sono state valutate con la metodica di Bach e Coll. (5) modificata (6).

I linfociti purificati mediante passaggio su colonne di nylon ed in seguito su Ficoll sono stati risospesi in TC Hanks alla concentrazione di  $6 \times 10^6$ /ml. Sono state quindi allestite 4 provette contenenti 1 ml circa di tale sospensione linfocitaria. Nella 1<sup>a</sup> provetta, dopo l'aggiunta di siero fetale di vitello (0,5 ml di una soluzione al 50% con TC Hanks) e di emazie di montone (0,25 ml di una soluzione all'1%) e dopo 1 ora di incubazione a +4°C, sono state contate le rosette E basali. Nella 2<sup>a</sup> provetta i linfociti sono stati lasciati per 3 ore a temperatura ambientale di 22°C circa, nella 3<sup>a</sup> provetta sono stati aggiunti ai linfociti 60  $\mu$  di H<sub>2</sub>O dist. e nella 4<sup>a</sup> provetta 60  $\mu$ l di una soluzione di Metisoprinolo allo 0,02%, contenente 12  $\mu$ g di sostanza attiva; ambedue le provette sono state lasciate per 3 ore a tempe-

TABELLA - EFFETTO «IN VITRO» DEL METISOPRINOLO SUI LINFOCITI T DI 17 BAMBINI AFFETTI DA  $\beta$ -THALASSEMIA MAJOR

	%	valore assoluto	percentuale di incremento	P
ROSETTE E BASALI	38,2 $\pm$ 6,2	1473 $\pm$ 297	—	—
ROSETTE E INCUBATE A 22°C PER TRE ORE	38,7 $\pm$ 6,5	1499 $\pm$ 285	1,7	NS
ROSETTE E INCUBATE A 22°C PER TRE ORE + H <sub>2</sub> O DISTILLATA	38,2 $\pm$ 5,3	1484 $\pm$ 284	0,7	NS
ROSETTE E INCUBATE A 22°C PER TRE ORE + 12 $\mu$ G di M.I.P. (')	47,2 $\pm$ 8,0	1810 $\pm$ 314	23,56	<0.001

NS = non significativo

(') M.I.P. = METISOPRINOLO

14

ratura ambiente di 22°C circa. Dopo tale incubazione si è proceduto come per le rosette E basali.

Abbiamo valutato anche concentrazioni di metisoprinolo allo 0,1%, 0,05% e 0,01%, ma la massima risposta di incremento si è ottenuta alla concentrazione dello 0,02% (20 mg/dl).

I linfociti T sono stati valutati sia in % sia in valore assoluto (n/mm<sup>3</sup>).

Analisi statistica: la Media  $\pm$  DS ed il test t di Student sono stati determinati con il Minicomputer Olivetti P6060.

## RISULTATI

Nella Tabella sono riportati i valori dei linfociti T (formanti rosette E) basali e dopo incubazione con acqua distillata o con aggiunta di Metisoprinolo. I risultati degli esperimenti condotti hanno mostrato che il numero dei linfociti T basali non è statisticamente influenzato o dal tempo di incubazione o dall'acqua distillata. I valori delle rosette E basali sono invece statisticamente più bassi ( $P < 0.001$ ), sia come percentuale che come valore assoluto, rispetto alle rosette E dei linfociti incubati per tre ore con Metisoprinolo allo 0,02%.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Una delle attività del Metisoprinolo risulta essere l'aumento «in vitro» della capacità dei linfociti di formare rosette E: il meccanismo d'azione rimane però ancora non ben chiarito, tenuto conto che è improbabile l'ipotesi di una azione del farmaco sui livelli intracellulari di cGMP (7), meccanismo, invece, già riconosciuto per il levamisolo (2).

La nostra ricerca dimostra la capacità del Metisoprinolo di indurre «in vitro» un incremento delle rosette E (espressione dei linfociti T) nei bambini affetti da  $\beta$ -Thalassemia major. Tali dati ci inducono a pensare che una parte delle «null cells» dei bambini affetti da  $\beta$ -thalassemia major siano T-linfociti che si sono fermati nella fase pre-T senza recettore e che il Metisoprinolo è in grado di far acquisire ad essi la capacità maturativa di formare rosette se incubati con eritrociti di montone.

Il Metisoprinolo è pertanto capace di indurre «in vitro» un effetto immunostimolante sui linfociti T.

## SUMMARY

Previous studies had demonstrated that in patients with thalassemia major exist a defect of T lymphocytes.

By means of incubation in vitro with metisoprinol of lymphocytes of such patients, now has been demonstrated that E rosettes (brief incubation in cold with SRBC) can be increased.

These results reveal that in thalassemia T null circulating cells exist and that they can be induced to switch to mature T cells.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Valcurone G., Brugo M.A., Tassi G.C.: Immunomodulatori, Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 59, 173, 1980.
- 2) Hadden J.W.: The Immunopharmacology of Immunotherapy. Springer Semin. Immunopathol., 2, 35, 1979.
- 3) De Mattia D., Mautone A., Altomare M., Schettini F.: Valutazione dei T-linfociti in bambini con thalassemia major. Acta Paed. Lat., 32, Suppl. 4, 703, 1979.
- 4) Musumeci S., Schilirò X., Romeo M.A., Sciotto A., Rosalba A., Pizzarelli G.: Lymphocyte change in  $\beta$ -thalassaemia major. Arch. Dis. Childh., 54, 954, 1979.
- 5) Bach J.F., Judet C., Arce S., Dormont J.: Exploration de la fonction thymique chez l'homme. II. Le phenomene des «rosettes-mouton» marquer des lymphocytes T chez l'homme. Nouv. Presse Med. 3, 655, 1974.
- 6) Laurentaci G., Favoino B., Losacco T.: Sul comportamento dei linfociti umani formanti rosetta E in miscele cellulari allogeneiche. Giorn. Batter. Virol. Immun., 69, 108, 1976.

## Sensibilizzazione precoce alle proteine del latte vaccino in lattante alimentato con lisati proteici

*Early sensitization to cow's milk protein in an infant after feeding with protein hydrolysate*

G. Messi, F. Spazzapan, P. L. Ferrari

Divisione Pediatrica, Ospedale Civile «Vitt. Emanuele III» - Gorizia

All'attuazione dell'alimentazione neonatale precoce (prima della «montata» latte) sono rapidamente seguiti i problemi relativi alla scelta dell'alimento.

È difatti noto che la somministrazione di preparati eterologhi solleva, e non solo per presupposti teorici, la questione della possibile sensibilizzazione da assorbimento intestinale di allergeni.

Pertanto vengono commentate criticamente le indicazioni di diete contenenti proteine, sia di origine animale (segnatamente dal latte vaccino) sia vegetale.

In teoria sembrerebbe opportuna soltanto la prescrizione di idrolisati proteici, a condizione di una accertata purezza (assenza di polipeptidi).

Nella realtà esistono soltanto derivati «ipoallergici» del latte vaccino, contenenti oltre a quote prevalenti di aminoacidi e peptidi, anche dosi variabili di peptoni (1).

Noi riteniamo che questi alimenti possano essere comunque utili nei primi giorni di vita, pur nella consapevolezza che il loro uso (preferenziale rispetto ai preparati non lisati) preserva solo in parte dal rischio di allergizzazione.

Ci sembra opportuna a tale proposito la descrizione di un caso pervenutoci recentemente.

### CASO CLINICO

M. David: Nato a termine da parto eutocico, da madre di 31 anni e da padre di 33 anni allergico a vari allergeni (non di tipo alimentare), col peso di 3.550 gr. è stato ricoverato presso la Pediatria Nido del nostro Ospedale. Dalla sesta ora di vita, è stato alimentato con un preparato del commercio a base di idrolisato di caseina fino all'inizio della «montata» latte materna, avvenuta in trentaseiesima ora; da allora nutrizione esclusivamente al seno materno. Dimesso in quarta giornata di vita, a domicilio ha sempre presentato suzione valida, crescita ponderale regolare, alvo normale.

A 4 mesi di vita la madre, desiderando svezzarlo dal seno, ha offerto un pasto con latte artificiale, in formula adattata, che però il bambino, dopo averne assaggiato un paio di cucchiaini ha vomitato, presentando lieve pallore e polipnea. Cinque giorni dopo la madre ha riproposto un pasto di latte vaccino intero con aggiunta di malto-destrine. Il piccolo ne ingeriva pochi millilitri, rifiutandone il rimanente. Pochi minuti dopo i genitori hanno notato la comparsa di disfonia e dispnea con cianosi periorale e subungueale, mentre sul volto si evidenziavano delle lesioni ponfoidi. Il bambino veniva condotto subito all'Ospedale e durante il tragitto (20-30 minuti) la sintomatologia regrediva parzialmente. All'ingresso, obiettivamente, si presentava agitato, il respiro era regolare, l'ascoltazione toracica e cardiaca normale, non dispnea, l'addome era piano, trattabile; c'era ancora un edema del volto e palpebrale, un eritema pruriginoso al tronco e chiazze orticarioidi al volto ed agli arti

inferiori. Veniva somministrata una compressa di betametasone da 5 mg. ed in circa 30 minuti la sintomatologia si risolveva completamente. Si riprendeva poi, l'alimentazione esclusivamente al seno. Il giorno seguente venivano eseguite alcune indagini (emocromo, VES, glicemia, azotemia, es. urine, EEG, ECG ed Rx torace) che non evidenziavano nulla di patologico. La conta degli eosinofili era di 360 cell./mm.<sup>3</sup>, le IgE totali 16 ng/ml (PRIST), il RAST (per latte vaccino) era chiaramente positivo (al IV° punto di taratura proposto della casa fornitrice).

Il bambino veniva dimesso dopo 3 giorni di degenza con la diagnosi di sospetta allergia al latte vaccino, raccomandando alla madre di proseguire l'alimentazione al seno e di evitare assolutamente la somministrazione di latte vaccino e derivati, od alimenti che contenessero tale prodotto. Ad un recente controllo, un mese dopo il ricovero, non veniva riferita alcuna manifestazione patologica.

IgE totali e RAST (per il latte vaccino) eseguiti nella madre, hanno rivelato valori normali.

### DISCUSSIONE

La sindrome anafilattica (vomito, collasso, orticaria) da allergia al latte vaccino è stata ormai bene illustrata (2-3); la produzione di IgE specifiche nei confronti delle Proteine del L.V. è correlata all'esposizione a piccole dosi di allergene laddove alte dosi continue inducono una risposta di tipo IgG e/o cellulare. Di particolare importanza per lo scatenamento di reazioni anafilattiche è la somministrazione del latte in due tempi: la prima sensibilizzante e la seconda scatenante.

È noto dagli ormai numerosi contributi della letteratura che il latte può essere precocemente sensibilizzato alle proteine del latte vaccino attraverso meccanismi diversi:

- a) passaggio diplacentare di antigeni specifici (4)
- b) assunzione di peptoni con il latte materno (5-6)
- c) nei tentativi precoci di svezzamento integrazione dell'alimentazione naturale (2-7).

La natura anafilattica della sintomatologia, presente nel nostro caso, è chiaramente dimostrata, oltre che nella tipicità della manifestazione clinica, anche dalla positività del RAST per le proteine del latte vaccino.

Pertanto sarebbe interessante poter individuare il momento in cui il bambino è stato sensibilizzato.

A nostro avviso la possibilità di primo contatto con le proteine eterologhe non è di facile localizzazione.

Quella del passaggio di allergeni attraverso la placenta od il latte materno resta pur sempre un'ipotesi affascinante, ma molto teorica. Ci sembra che nel nostro caso il reperto della RAST negatività nella madre possa orientare sufficientemente contro questa patogenesi.

Ad un precoce tentativo di somministrazione di latte artificiale - cinque giorni prima della crisi - è seguito immediatamente il vomito. Crediamo però ragionevole ritenere che proprio questo episodio svaluti tale tentativo di alimentazione innaturale come fattore determinante la sensibilizzazione, potendo anzi essere interpretato come primo segnale di allergia.

Piuttosto ci sembra di dover sottolineare che nelle prime ore di vita il bambino è stato nutrito con un alimento «ipoallergico» che indubbiamente contiene - sia pure in quantitativi non elevati - sostanze potenzialmente allergizzanti.

Riteniamo pertanto doverosa la segnalazione del possibile effetto sensibilizzante del lisato proteico, pur rilevando l'estrema rarità di tale evenienza.

Infatti noi indichiamo questi alimenti nelle prime ore di vita, ormai da diversi anni, e non abbiamo avuto prima d'ora motivi particolari di allarme, nonostante la scrupolosa sorveglianza clinica di tutti i neonati usciti dal nostro Ospedale per i primi diciotto mesi di vita.

#### SUMMARY

*A case of sensitization to cow's milk is described in an infant with a clinical aspect of type I<sup>o</sup> reaction. It results from the history only exposition to protein hydrolysis in the neonatal period.*

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) FREIER S.  
Gastrointestinal allergy in infancy - Diagnosis and management in: Symposium on gastrointestinal and alimentary allergy. Fisons Research Laboratory, Longborough 23 march, 1977.
- 2) VENTURA S., LONGO G., TAMBURLINI G.:  
Reaginic hypersensitivity to cow's milk proteins.  
Helv. Paed. Acta, in press (1981)
- 3) GERRARD J.W., MACKENZIE J.W.A., GOLUBOFF N., GARSON J.Z., MANINGAS C.S.:  
Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns.  
Acta Paed. Scand. 234 (suppl.): 1, 1973.
- 4) KUROMI T., OGURI M., MATSUMURA T., KAWASAKI I., KANBE Y., YAMADA T., KAWABE S., NEGISHI K.:  
Milk sensitivity and soybean sensitivity in the production of eczematous manifestation in breastfed infants with particular reference to intrauterine sensitization.  
Ann. allergy 37:41, 1976.
- 5) GERRARD J.W.:  
Allergy in breast fed babies to ingredients in breast milk.  
Ann. Allergy 42:69, 1979.
- 6) WARNER J.O.:  
Food allergy in fully breast-fed infants  
Clin. Allergy 10:133, 1980
- 7) STINZING G., ZETTERSTROM R.:  
Cow's milk allergy, incidence and pathogenetic role of early exposure to cow's milk formula.  
Acta Paed. Scand. 68:383, 1979.

Parole chiave :

Allergia al latte vaccino  
Idrolisati di caseina

Key words :

Cow's milk allergy  
Casein hydrolysis