

Azione della tossina alfa di *Clostridium welchii*
sulle cellule coltivate *in vitro*
Nota preliminare (*)

L'impiego delle tecniche di colture cellulari ha permesso l'adozione di nuovi metodi di valutazione quantitativa delle tossine e delle rispettive antitossine, metodi meno variabili e spesso più sensibili di quelli che impiegano gli animali di laboratorio; ha inoltre consentito lo studio della cinetica dell'azione delle tossine a livello cellulare e contemporaneamente lo studio del loro meccanismo di azione biochimica (1-16).

Partendo da queste considerazioni e proseguendo la serie di ricerche iniziate in questo Istituto da PENSO e VICARI, è stata studiata l'azione della tossina α di *Cl. welchii* sulle cellule in coltura; la presente nota riferisce i dati preliminari di tale studio.

MATERIALI E METODI.

Tossine. — Sono state impiegate le seguenti tossine:

1) Tossina α (SSA) allo stato secco, gentilmente inviata dall'Istituto Nazionale di Igiene di Varsavia. Tale tossina era stata ottenuta coltivando il ceppo *Cl. perfringens* A (SS) in terreno a base di idrolisato pancreatico di caseina secondo la tecnica di ADAMS e HENDEE (11).

2) Tossina α (10543), prodotta coltivando in brodo carne peptone il ceppo di *Cl. welchii* 10543 (BP 6K), secondo il metodo descritto da STEPHEN (12).

Antitossine. — Gli antisieri sono stati ottenuti tutti dallo Statens Seruminstitut di Copenhagen. Si sono usati:

1) Gas gangrene antitoxin (perfringens), international standard, 1 ml = 20 international units.

(*) Memoria presentata dall'Accademico GIUSEPPE PENSO.

2) *Clostridium welchii* (type B) antitoxin, international reference preparation; fornito come polvere liofilizzata e successivamente sciolto in soluzione fisiologica in modo da avere 1000 U.I./ml.

3) *Clostridium welchii* (type D) antitoxin, international reference preparation; fornito come polvere liofilizzata e successivamente sciolto in soluzione fisiologica in modo da avere 200 U.I./ml.

Cellule. — È stato impiegato il ceppo di cellule KB (13) e il suo clone St 1, isolato in laboratorio.

Preparazione delle colture cellulari per la valutazione dell'effetto citotossico delle tossine. 24 ore prima di ciascun esperimento veniva preparata una sospensione cellulare da una bottiglia di coltura di collezione. Le cellule venivano staccate dal vetro mediante versene al 0.02%.

Dopo il distacco delle cellule il versene veniva allontanato mediante centrifugazione a 500 r.p.m. per 1 minuto. Allontanato il supernatante, le cellule sedimentate erano sospese in terreno di crescita, costituito dal MEM di EAGLE (14) con aggiunta di aminoacidi non essenziali e del 10% di siero di vitello. La sospensione, dopo conteggio delle cellule in emocitometro di BREKKEK, veniva aggiustata in modo da ottenere da 2 a 4.10⁶ cellule/ml e distribuita in tubi in ragione di 0.5 ml/tubo. I tubi venivano quindi chiusi con tappo di gomma e incubati a 37°C. Dopo 24 ore si aveva uno strato cellulare confluyente: il terreno di crescita era allora sostituito con 1,8 ml/tubo di terreno di mantenimento, costituito da MEM con aggiunta del 2% di siero di vitello.

Le diluizioni di tossina e di tossina-antitossina erano preparate in soluzione tamponata di fosfati 0.01 M a pH 7.35, con aggiunta di 200 γ di gelatina/ml.

Prove di tossicità in vivo. — 0.5 ml di diluizioni scalari di tossina venivano inoculati endovena nella coda di topini del peso di 18-20 g. La DL 50 veniva calcolata con il metodo di SPEARMAN-KÄRBER in base alla mortalità dopo 48 ore in gruppi di 4 topini per dose. L'intervallo tra una dose e la successiva era del 30%.

Prove del potere lecitinasico in ovo. — Il potere lecitinasico delle preparazioni di tossina usate è stato saggiato su uovo, secondo la tecnica di ROTH e PILLEMER (15) leggermente modificata.

Un rosso d'uovo fresco, lavato due volte in soluzione fisiologica, è stato emulsionato in 400 ml di soluzione di acetato di calcio 0.005 M e di cloruro di sodio 0.15 M. L'emulsione è stata centrifugata 1 h $\frac{1}{2}$ a 4000 r.p.m., a +4°C. Al supernatante si sono aggiunti 10 g di caolino (lavato con acido, FISHER) e si è di nuovo centrifugato 20 minuti a 4000 r.p.m., a +4°C. Il sovrinatante, conservato a +4°C, è stato usato come substrato per il saggio dell'attività lecitinasica, previa diluizione a parti uguali, al momento dell'uso, con tampone borato (PALITSCH), a pH 6.7 (16).

Per l'esecuzione della prova, la preparazione di tossina era diluita serialmente per raddoppio in tampone borato, pH 6.7, con 0.02% di gelatina. A 1 ml di ogni diluizione in provetta di WASSERMANN si aggiungeva 1 ml di sospensione di rosso d'uovo. Le provette erano immerse in bagnomaria a 37°C e le letture fatte dopo 1 ora, mediante confronto con il controllo, allestito e incubato come le prove e con-

tenente 1 ml di tampone borato con gelatina al posto della diluizione di tossina. *Minima concentrazione reattiva* è stata considerata la più bassa concentrazione di tossina in grado di provocare una torbidità evidente nella miscela di reazione.

RESULTATI.

Le cellule KB sono sensibili alla tossina α di *Cl. seelkii*. L'azione della tossina si manifesta già dopo 4 ore e raggiunge il suo massimo alla ventiquattresima ora. Per questo motivo le letture per la determinazione della minima concentrazione reattiva (m.c.r.) sono state effettuate dopo 24 ore.

Nella tabella sotto riportata sono raccolti i risultati, relativi alle due tossine α da noi impiegate, delle prove comparative effettuate su cellule, su novo e nel topino:

	DL 50	m.c.r. su cellule KB	m.c.r. su novo
Tossina 88 A	0.45 mg [0.9 mg/ml]	0.25 mg/ml	0.05 mg/ml
Tossina 10543	0.026 ml [0.052 ml/ml]	0.025 ml/ml	0.002 ml/ml

Dalla tabella si può notare come l'attività sui diversi sistemi rivelatori si svolga, con una buona approssimazione, parallelamente per le due tossine impiegate.

Le prove di citotossicità effettuate in presenza di antisiero a livello di 0.01 e 0.05 U.I. di antitossina α , mentre hanno provato che l'azione citotossica della α tossina è specificamente inibita dall'antisiero corrispondente, non hanno tuttavia ancora consentito di determinare con precisione i valori I_h e I_s , e di paragonarli quindi con gli stessi valori ottenuti in vivo o in novo.

DISCUSSIONE.

Le esperienze effettuate hanno dimostrato che la tossina α di *Cl. seelkii* ha un'azione citotossica sulle cellule coltivate in vitro. Il metodo delle colture cellulari è da 2 a 4 volte circa più sensibile del metodo in vivo, ma è da 5 a 10 volte circa meno sensibile del metodo in novo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) G. PENSO, G. VICARI, *Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei*, serie 8, 22, 772 (1957).
- (2) G. PENSO, G. VICARI, *Immunological Phenomena studied by the Tissue Culture Method. Proc. 3rd International Meeting of Biological Standardization, Opatija*, p. 11 (1957).
- (3) G. PENSO, G. VICARI, *Abstracts of Communications, 7th International Congress for Microbiology, Stockholm*, Uppsala (Almqvist and Wiksells), p. 223 (1958).
- (4) G. VICARI, A.L. OLITZKI, Z. OLITZKI, *Br. J. Exp. Path.*, 41, 179 (1960).
- (5) E.S. LENNON, A.S. KAPLAN, *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.*, 95, 700 (1957).
- (6) A.S. KAPLAN, E.S. LENNON, *Abstracts of Communications, 7th International Congress for Microbiology, Stockholm*, Uppsala (Almqvist and Wiksells), p. 219 (1958).
- (7) N. STRAUSS, E.D. HENDER, *J. Exp. Med.*, 109, 145 (1959).
- (8) N. STRAUSS, *J. Exp. Med.*, 112, 351 (1960).
- (9) I. KATO, A.M. PAPPENHEIMER, *J. Exp. Med.*, 112, 329 (1960).
- (10) E.A. KARAT, M.M. MATER, *Experimental Immuno-chemistry*, 2nd ed., Thomas, Springfield, 1961, p. 820.
- (11) M.H. ADAMS, E.D. HENDER, *J. Immunol.*, 51, 249 (1945).
- (12) J. STEPHEN, *J. Biochem.*, 59, 578 (1961).
- (13) H. EAGLE, *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.*, 89, 362 (1955).
- (14) H. EAGLE, *Science*, 129, 432 (1959).
- (15) F.B. ROTH, I. PILLEMER, *J. Immunol.*, 70, 533 (1953).
- (16) W.M. CLARK, *The determination of Hydrogen ions*, Williams, Wilkins Co, Baltimore, 1927, p. 115, 117.