

UN NUOVO TEST DI FUNZIONALITA' FAGOCITARIA BASATO SULLA MISURA DELLA PRODUZIONE DI ANIONE SUPEROSSIDO (O_2^-). I. PRINCIPI GENERALI ED ESECUZIONE

P. Bellavite, P. Dri*, G. Berton e G. Zabucchi*

Riassunto

P. Bellavite, P. Dri, G. Berton e G. Zabucchi

Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla misura della produzione di anione superossido (O_2^-). I. Principi generali ed esecuzione

LAB, J. Res. Lab. Med., VII, 1, 67-76, (1980).

L'ingestione e l'uccisione dei microorganismi da parte dei granulociti richiede la cooperazione di svariati sistemi umorali e cellulari. Fra questi diversi meccanismi sono esaminati in particolare quelli deputati alla opsonizzazione e quelli coinvolti nella attivazione metabolica leucocitaria che accompagna la fagocitosi. Vengono inoltre elencati i difetti di funzionalità fagocitaria conosciuti in patologia umana. La diagnosi di tali forme morbose si basa su una serie di indagini laboratoristiche che però, data la loro alta specializzazione, non sono alla portata di tutti i laboratori. In questo lavoro viene descritto un metodo semplice per la valutazione della funzionalità fagocitaria basato sulla misura quantitativa del superossido (O_2^-) prodotto dai granulociti. Il test, che si applica su sangue intero, consente la diagnosi dei difetti di opsonizzazione e di attivazione metabolica leucocitaria e presenta notevoli vantaggi rispetto agli altri metodi che esaminano gli stessi fenomeni biologici.

Summary

P. Bellavite, P. Dri, G. Berton and G. Zabucchi

A new test for phagocytic function that measures superoxide anion (O_2^-) production. I. General principles and method

LAB, J. Res. Lab. Med., VII, 1, 67-76, (1980).

Phagocytosis is one of the main defenses against bacterial infection. Ingestion and killing of bacteria require the cooperation of both humoral factors and granulocytes. Among the humoral factors, opsonins are particularly important in aiding granulocytes in taking up bacteria. On the other side, the functional integrity of granulocytes is required for the clearance of invading microorganisms. A review of a variety of human diseases known to be related to phagocytic disorders is presented. The diagnosis of such disorders is at present performed by means of sophisticated tests that cannot be done in every laboratory. We describe in this paper a simple and rapid test for the evaluation of phagocytic function based on the quantitative measurement of superoxide anion (O_2^-) generated by granulocytes. The assay is performed on whole blood and allows the diagnosis of defective granulocyte function. The advantages with respect to other method employed for the assessment of phagocytic function are also discussed.

I fenomeni biologici coinvolti nella funzionalità fagocitaria dei granulociti

La principale funzione dei granulociti, o leucociti polimorfonucleati (PMN) è costituita dalla fagocitosi. Essa è uno dei più importanti meccanismi di difesa contro le infezioni batteriche. La fagocitosi avviene attraverso varie fasi, costituite da a) contratto tra cellula e particella da fagocitarie, b) inglobamento, c) uccisione e/o digestione del materiale ingerito¹⁻⁴.

La fase del contatto è preceduta da un movimento atti-

vo del fagocita verso la particella. Tale fenomeno è chiamato chemiotassi⁵⁻⁷. Alla fase del contatto segue quella dell'inglobamento, che consiste nella emissione di pseudopodi da parte del fagocita, i quali circondano la particella da fagocitare, si congiungono e saldandosi tra loro danno origine a una vescicola detta fagosoma. Perché la fagocitosi si compia è indispensabile che il fagocita riconosca il materiale con cui è venuto a contatto: questa capacità di discriminare dipende in gran parte da fattori umorali, cioè da sostanze che rivestono la particella da fagocitare e permettono che questa venga riconosciuta dal fagocita tramite recettori presenti sulla plasmamembrana. L'azione di queste sostanze è detta opsonizzazione. L'effetto opsonizzante è esercitato da:

- anticorpi specifici che si legano con i determinanti

Questo lavoro è stato realizzato con il contributo del C.N.R. N° 78.02258.04

Istituto di Patologia Generale, Università di Padova - Sede di Verona

*Istituto di Patologia Generale, Università - Trieste

Lavoro giunto in Redazione il 20-11-1979

antigenici della particella estranea, b) frazioni del complemento, attivato dal frammento Fc dell'anticorpo legato all'antigene o attivato attraverso la via alternata, che costituisce un meccanismo importante di opsonizzazione, efficace in particolare per materiali verso cui non esiste un'immunità specifica⁸⁻¹¹.

Subito dopo la fagocitosi, i granuli specifici ed azurofilici si fondono con il fagosoma e le proteine granulari sono scaricate direttamente sulla particella fagocitata. Alcune di queste proteine sono di per sé battericide o batteriostatiche, come ad esempio il lisozima, la lattoferrina e le proteine cationiche; altre, ad attività enzimatica, sono utilizzate per la uccisione, la digestione e la degradazione della particella fagocitata¹²⁻¹⁴.

Un meccanismo molto importante per l'uccisione dei microorganismi dipende dalla produzione di acqua ossigenata. In presenza di I⁻ e Cl⁻ la mieloperossidasi dei granuli azurofilici può utilizzare l'H₂O₂ per uccidere i batteri¹⁵⁻¹⁶. L'attività battericida viene anche esplicata direttamente da molecole altamente tossiche quali i radicali liberi dell'ossigeno prodotti durante l'attivazione metabolica delle cellule messe in moto dalla fagocitosi¹⁷. E' quest'ultima funzione dei granulociti che interessa in modo particolare l'argomento di questo lavoro e che descriveremo qui di seguito.

Quando opportunamente stimolati da particelle fagocitabili o da sostanze solubili che interagiscono con la plasmamembrana i fagociti rispondono con una marcata attivazione del metabolismo cellulare. Oltre che da particelle come batteri, polistirolo, zimosan opsonizzato, immunocomplessi aggregati, tale fenomeno può essere indotto anche da detergenti, anticorpi antileucocitari, fosfolipasi c, alcuni acidi grassi, forbolo-miristato acetato, frammenti di complemento, callicreina, ionofori, citocalasina E, ioni lantanio, ioni fluoruro, endotossine, N-formil metionil peptidi. I principali eventi che caratterizzano l'attivazione metabolica sono: a) aumento del consumo di ossigeno, b) aumento della velocità di ossidazione del glucosio attraverso la via dell'esoso monofosfato, c) aumento della produzione di H₂O₂, di anione superossido (O₂⁻) e di altri radicali liberi¹⁷⁻²². Tali eventi sono tra loro strettamente correlati: si

ritiene che il contatto con l'agente stimolante induca l'attivazione di una "NADPH ossidasi" cellulare la cui attività è responsabile della riduzione dell'O₂ a O₂⁻ e quindi ad H₂O₂ e della formazione di NADP⁺^{23,24}. L'attivazione della ossidazione del glucosio attraverso la via dell'esoso monofosfato è causata dall'aumento del rapporto NADP⁺/NADPH, aumento dovuto sia all'attività della stessa ossidasi, sia alla attività del ciclo del glutatione, impegnato nella degradazione dell'H₂O₂ prodotta in eccesso. Uno schema riassuntivo di tali interrelazioni metaboliche è rappresentato in Figura 1.

Indicazioni per l'esame della funzionalità fagocitaria

Data l'importanza della fagocitosi come meccanismo di difesa aspecifico e specifico, difetti nei meccanismi di attivazione e/o di funzionamento del sistema fagocitario descritto sono alla base di grave diminuzione nella capacità di difesa dalle infezioni. Lo studio della funzionalità fagocitaria è quindi necessario nella pratica clinica nei casi di pazienti che presentano infezioni ricorrenti e in cui si sospetti l'esistenza di un deficit funzionale della fagocitosi.

Tab. I - Classificazione fisiopatologica dei difetti di funzionalità fagocitaria

DIPENDENTI DA FATTORI UMORALI

Difetti di opsonizzazione (v. Tab. II)
Difetto di fattori chemiotattici
Presenza di inibitori della chemiotassi

DIPENDENTI DALLE CELLULE

Difetti di chemiotassi a livello cellulare
Difetti di ingestione
Difetti di degranulazione
Carenza di mieloperossidasi
Difetti di attivazione metabolica (v. Tabella III)

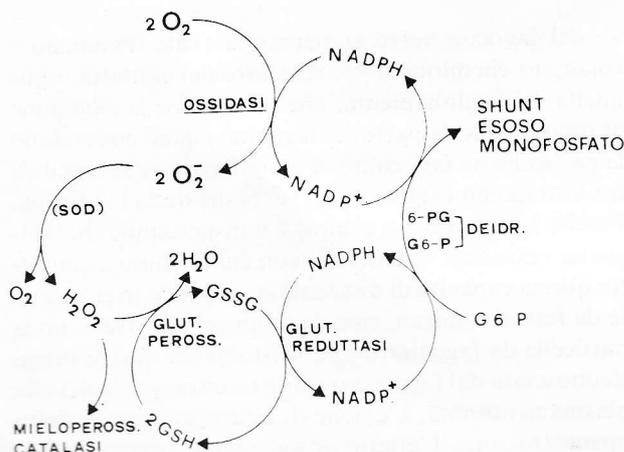


Fig. 1 - Interrelazioni metaboliche nei leucociti polimorfonucleati in fagocitosi

Poichè i meccanismi coinvolti nel sistema fagocitario sono molto complessi, anche i fenomeni patologici possono essere dovuti a difetti che si trovano a diversi livelli. Schematicamente, la diminuzione di funzionalità fagocitaria può dipendere da: a) difetto nei sistemi umorali coinvolti nella formazione di fattori chemioattivi e/o opsonizzanti, b) anomalie a livello cellulare che rendono i granulociti incapaci di attuare l'uccisione dei microorganismi con cui vengono a contatto. La Tabella I riassume le condizioni che possono essere alla base di deficit di funzionalità fagocitaria. Per una trattazione completa si rimanda a rassegne specializzate^{5,7,15,25,26}. Qui consideriamo in particolare i difetti di opsonizzazione e quelli che sono associati ai meccanismi cellulari che portano alla attivazione metabolica.

Una diminuzione della capacità opsonizzante del plasma è stata descritta in caso di difetti congeniti o acquisiti di frazioni complementari ed anche in associazione con altre situazioni para-fisiologiche o patologiche²⁷⁻³¹. Un elenco delle condizioni in cui è stata dimostrata una

Tab. II - Condizioni in cui è stato dimostrato un difetto nella capacità opsonizzante del plasma

Deficit di C4	(27)
Deficit di C3	(27-30)
Ipercatabolismo di C3	(31, 32)
Disfunzione di C5	(33)
Deficiti di C7	(34)
Neonati	(35-37)
Artrite reumatoide	(38)
Lupus eritematoso sistemico	(39)
Ustioni gravi	(40)
Infezioni	(41)

anomalia del potere opsonizzante è riportato in Tabella II. Nella maggior parte dei casi riportati, il materiale utilizzato per le prove di opsonizzazione è lo zimosan. Le anomalie dipendenti dalle cellule sono riportate in Tabella III. I difetti primitivi sono più rari, ma caratterizzati da una maggiore gravità di manifestazioni cliniche conseguenti alla caduta del potere di difesa dalle infezioni. Un accenno in particolare merita la malattia granulomatosa cronica dell'infanzia (CGD), che è la sindrome paradigmatica dei difetti di funzione fagocitaria legati ad anomalie del metabolismo ossidativo leucocitario. Tale grave malattia si manifesta con ricorrenti episodi infettivi a carico della cute, dei linfonodi, dei polmoni e di altri organi interni e spesso porta a morte i pazienti già in giovane età. Essa è dovuta ad una anomalia ereditaria della funzione dei PMN i quali, pur inglobando normalmente i batteri, hanno una scarsa o nulla capacità di uccidere i microorganismi fagocitati, in particolare quelli catalasi-positivi, come stafilococchi, E. coli, Serratia marcescens.

Caratteristicamente, il metabolismo leucocitario nella CGD mostra una totale assenza di stimolazione respiratoria in fagocitosi, di produzione di H_2O_2 e di O_2^{-} ^{42,46}.

Tab. III - Condizioni in cui è stato dimostrato un difetto di attivazione metabolica dei granulociti

A. PRIMITIVE (difetto totale)	
Malattia granulomatosa cronica (e sue varianti)	(42-46)
Deficit di G6PD con <di 5% di attività residua	(47-49)
B. ASSOCIATE ALLE SEGUENTI CONDIZIONI: (difetto di solito parziale)	
Periodo neonatale	(50-52)
Età avanzata	(53)
Deficienza di glutatione perossidasi	(54)
Sindrome di Down	(55-56)
Ipotiroidismo	(57)
Malnutrizione	(58-60)
Cirrosi alcolica	(61)
Deficienza di ferro	(62, 63)
Ustioni	(64, 65)
Artrite reumatoide	(66)
Lupus eritematoso sistemico	(67)
Tumori maligni	(68)
Leucemie	(69-72)
Radiazioni ionizzanti	(73-75)
Farmaci: corticosteroidi	(76-80)
sulfamidici	(81)
fenilbutazone	(79, 82)
colchicina	(83)
tetraciclina	(84)
C. ALTRE OSSERVAZIONI ISOLATE:	
	(85, 86)

Le forme secondarie di deficit metabolico fagocitario sono solitamente caratterizzate da un'inefficienza *parziale* dei sistemi che portano all'attivazione della cellula. Poichè però anche in questi casi è spesso presente un'aumentata suscettibilità alle infezioni, può comunque essere utile al clinico valutare la funzionalità delle difese fagocitarie di pazienti affetti da varie malattie o tenere sotto controllo tale parametro durante il trattamento con farmaci potenzialmente dannosi a questo livello (vedi Tab. III).

Metodi di studio della funzionalità fagocitaria e loro limiti

Per valutare in modo completo l'efficienza della funzionalità fagocitaria, è possibile, anzi è consigliabile, attuare un'ampia serie di indagini che studino i diversi aspetti del processo fagocitario. I principali test che vengono utilizzati sono quelli della chemiotassi in vivo^{7,87} o in vitro^{7,88}, della fagocitosi intesa come capacità e velocità di ingestione⁸⁹, della attività battericida⁸⁹, della attivazione metabolica^{19,22,88-94}. Una trattazione completa di tutte queste tecniche esula dagli scopi di questo lavoro; qui sono analizzati in particolare il significato e i limiti dei metodi che si basano sulla misura dei parametri metabolici come indice di funzionalità fagocitaria, in quanto è in tale gruppo che si colloca anche il metodo oggetto di questo lavoro.

I metodi di studio dei diversi fenomeni che si verificano durante la attivazione metabolica dei PMN sono: a) misurazione del consumo di O_2 , polarograficamente con l'elettrodo di Clark o manometricamente con la metodica di Warburg^{19,22}, b) attivazione della ossidazione del glucosio marcato in C-1 e misura della $^{14}CO_2$ liberata⁸⁸⁻⁹⁰, c) misurazione del rilascio di H_2O_2 con metodi spettrofotofluorimetrici o colorimetrici^{22,91}, d) test NBT (nitro blu di tetrazolio), composto che dai PMN viene ridotto a formazano insolubile⁹²⁻⁹⁴. Recentemente anche la misura della produzione di O_2^{-} è stata usata nella diagnosi di CGD^{44,91}.

I primi tre metodi sono di sicuro affidamento ma non possono essere adottati nella pratica corrente di tutti i laboratori per la complessità dell'esecuzione e della strumentazione necessari o anche perchè la maggior parte di essi richiede l'isolamento dei PMN dal sangue e l'utilizzazione di un gran numero di cellule, problema non indifferente in caso di pazienti in giovane età o leucopenici. Il quarto metodo, il test NBT, dà per scontato che l'NBT viene ridotto dall' O_2^{-} a formazano; questo composto viene osservato al microscopio in forma di zolle intracitoplasmatiche oppure viene misurato spettrofotometricamente. La più semplice variante del test, consistente nella conta microscopica delle cellule "NBT positive", può servire come test di screening puramente orientativo ma richiede in ogni caso una conferma diagnostica con altre metodiche. Il test NBT quantitativo, consistente nella misura spettrofotometrica del formazano generato nel corso dell'incubazione di leucociti con o senza l'agente stimolante in presenza dell'NBT, è più preciso di quello istochimico, ma è scarsamente utilizzato nella pratica laboratoristica corrente a causa de-

gli inconvenienti dovuti alla laboriosità dell'esecuzione: è necessario, dopo l'incubazione, centrifugare le provette e poi estrarre il formazano dal fondello leucocitario con vari passaggi in solventi organici. Altri aspetti che limitano le possibilità di applicazione del test NBT quantitativo sono il fatto che esso richiede l'isolamento dei PMN dal sangue (ne sono necessari almeno 10 ml), il fatto che l'NBT viene ridotto con notevole velocità anche dalle cellule non stimolate, e il fatto che le particelle di formazano possono esse stesse venire fagocitate ed interferire perciò con la attivazione metabolica indotta dagli agenti stimolanti usati⁹²⁻⁹⁶. Quest'ultimo inconveniente ne ostacola la applicazione ai test di opsonizzazione.

Descrizione del test di misura dell'anione superossido per l'esame della funzionalità fagocitaria

Il test qui descritto consiste nella misura dell' O_2^- prodotto dai granulociti del sangue durante la fagocitosi e a riposo.

A) Principi teorici e schemi

Le seguenti acquisizioni sono alla base del metodo elaborato e più sotto descritto nei dettagli: a) I granulociti normali producono e rilasciano all'esterno della cellula grandi quantità di O_2^- quando sono opportunamente stimolati. Difetti di attivazione metabolica si accompagnano a diminuzione o assenza totale di produzione di O_2^- ⁹⁷. b) E' possibile misurare esattamente la quantità di O_2^- mediante l'introduzione, nel mezzo di incubazione, del citocromo c^{21,22}. Tale composto, che non interferisce col metabolismo cellulare²², viene ridotto dall' O_2^- secondo la reazione:



Il citocromo c ridotto viene determinato spettrofotometricamente, in base alla differenza di assorbanza tra 550 e 468 nm. Mentre allo stato ossidato il citocromo c a quelle lunghezze d'onda presenta la stessa densità ottica, con la riduzione si ha un aumento di assorbanza a 550 nm e una diminuzione a 468 nm: la differenza è proporzionale alla quantità di citocromo c ridotto. c) Per verificare quale parte della riduzione del citocromo c avvenga ad opera dell' O_2^- e quale aspecificamente, è possibile eseguire dei controlli in presenza dell'enzima superossido dismutasi (SOD) che, dismutando con alta velocità l' O_2^- , impedisce che vada a ridurre il citocromo c²². d) La misura dell' O_2^- può essere utilizzata come indice della capacità opsonizzante del plasma. A tale scopo viene utilizzato lo zimosan come particella fagocitabile. Esso infatti è in grado di stimolare la fagocitosi e quindi la produzione di O_2^- solo dopo essere stato opportunamente opsonizzato. La misura del rilascio di superossido da parte di leucociti stimolati con zimosan trattato con plasma (o siero) diventa quindi anche un sistema rivelatore della capacità opsonizzante di tale plasma.

La Figura 2 riassume visivamente i fenomeni biologici qui sopra descritti. In essa si nota che l'intero sistema consta di due momenti fondamentali: 1) opsonizzazione

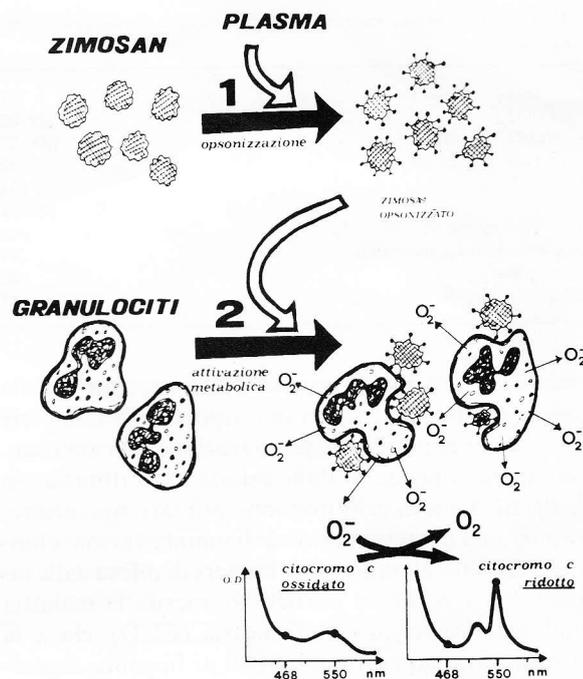


Fig. 2 - Principi biologici su cui si fonda la misura della produzione di superossido da parte dei granulociti in presenza di zimosan opsonizzato

ne dello zimosan e 2) stimolazione metabolica dei leucociti con produzione di O_2^- .

B) Materiali

Citocromo c, fornito dalla ditta Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo (USA). Preparare una soluzione 2.3 mM in KRP. Conservata a 4°C è stabile per 2-3 giorni, in congelatore è stabile per alcune settimane. Superossido dismutasi (SOD), fornita dalla ditta Sigma, oppure dalla Biotics Research Corp., Houston, Tex. (USA). La soluzione (2.5 mg/ml, in H₂O) va conservata in congelatore ed è stabile per diverse settimane. Zimosan A, fornito dalla ditta Sigma. Prima di essere utilizzato deve essere sospeso in soluzione fisiologica, bollito a bagno maria per 15 min, centrifugato e risospeso in KRP. Così preparato si può conservare a 4°C per qualche giorno. Tampone Krebs-Ringer-Fosfati (KRP), è costituito da 21 ml di tampone sodio fosfato 0.1 M, pH 7.4; 100 ml di NaCl 0.154 M; 1 ml di MgCl₂ 0.154 M e 4 ml di KCl 0.154 M. Al KRP devono essere sempre aggiunti glucosio e calcio cloruro alla concentrazione finale di 5 mM e 0.5 mM rispettivamente.

C) Metodi

La misura del superossido è stata applicata al sangue umano secondo due metodiche fondamentali: nella prima, chiamata test "diretto", si è usato sangue intero, nella seconda, chiamata test "in due fasi", si è usato sangue lavato e si è utilizzato il plasma a parte per l'opsonizzazione dello zimosan.

1) Test "diretto": Con questa metodica si incuba sangue intero con zimosan, in presenza di citocromo c. Le fasi della opsonizzazione e della attivazione metabolica con produzione di superossido (vedi Fig. 2) hanno luogo simultaneamente nella stessa provetta. Ciò consente

di stabilire rapidamente il grado di efficienza del sistema fagocitario esaminato nella sua globalità, pur senza indicare precisamente a quale stadio si trovi un eventuale difetto. Inoltre, poiché si esegue il saggio in presenza del plasma, con questo test si può svelare un'eventuale presenza di sostanze inibitrici della fagocitosi. Poiché è possibile che il plasma causi una piccola quota di riduzione aspecifica del citocromo c, si esegue un controllo con SOD: la riduzione del citocromo c osservata nella prove eseguite in presenza di questo enzima viene sottratta a quella osservata nelle prove eseguite in sua assenza, ottenendo con ciò la quota dovuta realmente al superossido.

Esecuzione della prova (vedi anche la Tab. IV):

1) Allestimento delle provette. Per ogni campione di sangue in esame si allestiscono due provette di plastica da 10 ml, marcate "A" e "B". La provetta A contiene 1 mg di zimosan e 3 mg di citocromo c, sciolti in 0.8 ml di tampone KRP. La provetta B contiene gli stessi componenti più 50 µg di SOD. nel caso si voglia avere anche il dato della attività basale, cioè in assenza di stimolazione, si allestiscono anche due provette, A' e B', in cui si omette lo zimosan.

2) Saggio. Le provette sono poste a preriscaldare per 5 minuti a 37°C. Il saggio inizia con l'aggiunta di 0.2 ml di sangue -reso incoagulabile con 10 U/ml di eparina- e

quindi viene incubato per 15 min. a 37°C, con agitazione sostenuta (circa 100 colpi/min). Al termine si blocca la reazione con l'aggiunta di 4 ml di KRP freddo (+4°C) e si centrifugano le provette a 2000 g per 10 min. 3) Calcolo del superossido. Sui soprannatanti si misura la differenza di densità ottica tra 550 e 468 nm (Δ OD nella Tabella IV). Al valore ottenuto nella prova A (senza SOD) si sottrae quello ottenuto nella prova B (con SOD). La differenza di OD tra le prove senza e con SOD viene moltiplicata per:

$$\frac{5}{0.0245} \text{ (fattore di diluizione del saggio col KRP)}$$

$$0.0245 \text{ (coefficiente di estinz. } \mu\text{M del citocromo c)}$$

Il risultato indica le nanomoli di superossido prodotte nel tempo di saggio da parte dei leucociti contenuti in 0.2 ml di sangue. E' opportuno esprimere il risultato in termini di nmoli di O_2^- prodotte da 10^6 granulociti, onde consentire confronti tra campioni di diversi soggetti in esame. A questo scopo viene eseguita una conta leucocitaria e una formula.

II) Test "in due fasi". Nel caso che il test "diretto" evidenzi la presenza di un difetto di funzionalità fagocitaria, sorge il quesito se si tratti di un difetto di opsonizzazione oppure di un difetto a livello cellulare. Infatti il test "diretto" non è in grado di distinguere tra questi

Tab. IV - Schema del metodo "diretto" per la misura della produzione di superossido da sangue intero

	Sangue + Zimosan		Sangue senza Zimosan	
	A	B	A'	B'
n° provette:	A	B	A'	B'
Tampone KRP*	0.6	0.58	0.7	0.68
Citocromo c 30 mg/ml	0.1	0.1	0.1	0.1
SOD 2.5 mg/ml	—	0.02	—	0.02
Zimosan 10 mg/ml	0.1	0.1	—	—
-- Incubare 5 min a 37°C --				
Sangue intero	0.2	0.2	0.2	0.2
-- Incubare 15 minuti a 37°C con agitazione --				
-- Bloccare la reazione con 4 ml di tampone KRP freddo (+4°C) e centrifugare per 10 min. a 2000 g --				
-- Leggere la assorbanza (O.D.) dei soprannatanti.				

RISULTATI (esempio)		A	B	A'	B'
Lettura O.D.	a 550 nm:	0.700	0.450	0.450	0.440
	a 468 nm:	0.300	0.350	0.350	0.350
	Δ O.D.:	0.400	0.100	0.100	0.090
Differenza A-B e A'-B':		0.300		0.010	
Calcolo O_2^- prodotto					
(O.D.A-B x $\frac{5}{0.0245}$):		61.2 nmoli		2.0 nmoli	
nmoli O_2^- / 10^6 granulociti:**		76.5		2.5	

*Al KRP sono aggiunti glucosio (5mM) e $CaCl_2$ (0.5 mM)

**Nell'ipotesi che la concentrazione di granulociti nel sangue sia di 4000/mm³

Citocromo c, SOD e zimosan sono sciolti o sospesi in KRP. I volumi sono dati in ml

Tab. V - Schema del saggio di misura del superossido secondo il test "in due fasi"

n° provette:	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Tampone KRP*	0.6	0.58	0.6	0.58	0.6	0.58	0.6	0.58
Citocromo c	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SOD	—	0.02	—	0.02	—	0.02	—	0.02
Zimosan opson:								
con plasma Paziente	0.1	0.1	—	—	0.1	0.1	—	—
con plasma Controllo	—	—	0.1	0.1	—	—	0.1	0.1
-- Incubare 5 min a 37°C								
Cellule del Paziente	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—	—	—
Cellule del Controllo	—	—	—	—	0.2	0.2	0.2	0.2

-- Incubare 10 min. a 37°C con agitazione --

-- Bloccare la reazione con 4 ml di tampone KRP freddo (+4 °C) e centrifugare per 10 min. a 2000 g --

-- Leggere la assorbanza dei sopranatanti

Risultati (esempio**)	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
O.D. 550 nm:	0.450	0.430	0.800	0.400	0.460	0.430	0.820	0.450
O.D. 468 nm:	0.380	0.390	0.250	0.390	0.390	0.400	0.260	0.380
Δ O.D.:	0.70	0.040	0.550	0.050	0.070	0.030	0.560	0.070
Differenza A-B:	0.030		0.500		0.040		0.490	
Calcolo O ₂ prodotto								
(O.D. A-B x $\frac{5}{0.0245}$):	6.1		102.0		8.2		100.0	

*Al KRP sono aggiunti glucosio (5mM) e CaCl₂ (0.5 mM)

**Nell'ipotesi che il Paziente sia affetto da deficit del potere opsonizzante del plasma. Per semplicità non sono stati riportati i calcoli del superossido prodotto per 10⁶ granulociti

Citocromo c, SOD e zimosan sono sciolti o sospesi in KRP alle concentrazioni di 30 mg/ml, 2.5 mg/ml e 10 mg/ml rispettivamente. I volumi sono dati in ml

due gruppi di patologia della fagocitosi. Con il metodo "in due fasi" è possibile indagare separatamente la fase della opsonizzazione (cioè il potere opsonizzante del plasma) e la fase della stimolazione metabolica dei granulociti in fagocitosi. Per ottenere ciò si separa il plasma dalle cellule e si esegue il test in due stadi successivi, di cui il primo consiste nella opsonizzazione dello zimosan con plasma del paziente e con plasma di controllo, e il secondo consiste nella misurazione del superossido prodotto dai leucociti (vedi Fig. 2).

Esecuzione della prova:

1) Preparazione del plasma e delle cellule ematiche. 2 ml di sangue del paziente e di un controllo sano -resi incoagulabili con 10 U/ml di eparina - vengono raccolti in provette di plastica e centrifugati a 1500 g per 10 min. Si preleva il plasma, che si userà per l'opsonizzazione dello zimosan. Il fondello contenente le cellule ematiche viene lavato 2 volte con 8 ml di KRP ed infine risospeso in KRP ad un volume uguale a quello iniziale. Ad ogni passaggio agitare bene il contenuto delle provette ed alla fine contare i leucociti presenti e fare la formula. Per ogni provetta del saggio di misura del superossido si useranno 0.2 ml della sospensione cellulare così preparata.

2) Opsonizzazione dello zimosan. Lo zimosan viene opsonizzato sia con il plasma del paziente che con il plasma di controllo. A questo scopo si sospendono 5 mg di

zimosan con 0.5 ml di plasma e 4.5 ml di KRP (concentrazione finale del plasma = 10%), si incuba 20 min a 37°C, con agitazione. Se necessario, si possono effettuare anche diverse diluizioni del plasma e/o diversi tempi di incubazione. Al termine, le due preparazioni vengono centrifugate a 2000 g per 5 min., lavate una volta con KRP e infine risospese con 0.5 ml dello stesso tampone, ad una concentrazione di 10 mg di zimosan/ml.

3) saggio di misura del superossido. In provette di plastica da 10 ml, si cimentano le cellule del paziente e del controllo con le due preparazioni di zimosan, secondo lo schema presentato in Tabella V, e si misura la produzione di O₂⁻, indice della stimolazione metabolica. Ogni provetta contiene 1 mg di zimosan opsonizzato come descritto al punto 2 e 3 mg di citocromo c, sciolti in KRP, per un volume di 0,8 ml (comprese le cellule, il volume finale del saggio è di 1 ml). Le provette "B" contengono anche 50 µg di SOD. La prova inizia con l'aggiunta di 0.2 ml di sospensione cellulare, preparata come descritto al punto 1. Si incuba 10 min. a 37°C, con agitazione e, al termine, si blocca la reazione con l'aggiunta di 4 ml di KRP freddo (+ 4°C) e si centrifuga a 2000 g per 10 min. Da questo punto il procedimento è analogo a quello descritto precedentemente per il test "diretto".

La Tabella V riporta, oltre alle indicazioni per l'allesi-

7

mento delle provette, anche un esempio-tipo di risultati che si possono ottenere con il test "in due fasi", nel caso che il paziente in esame sia portatore di un difetto nel potere opsonizzante del plasma. Il risultato dimostra che lo zimosan trattato con plasma del paziente (prove 1 e 3) induce una bassissima stimolazione della produzione di O_2^- , mentre lo zimosan opsonizzato con il plasma normale (prove 2 e 4) stimola sia le cellule del controllo che quelle del paziente: queste ultime quindi risultano normalmente efficienti e il difetto può essere in questo caso attribuito esclusivamente a fattori umorali. Nel caso invece, il paziente in esame fosse affetto da una anomalia della fagocitosi a livello cellulare, il difetto si sarebbe manifestato con una scarsa o nulla produzione di O_2^- nelle prove 1 e 2.

Conclusioni

Il test descritto in questo lavoro è stato messo a punto con lo scopo di ottenere un metodo sensibile, semplice e attendibile di valutazione della funzionalità fagocitaria e in particolare dei due aspetti principali di essa, che sono l'opsonizzazione e l'attivazione metabolica leucocitaria.

L'inadeguatezza delle attuali metodiche di indagine in questo campo è già stata sopra prospettata. I vantaggi del test qui descritto rispetto agli altri metodi possibili per esaminare lo stesso fenomeno sono molteplici. Innanzitutto una importante innovazione sta nel fatto che si può esaminare nella sua globalità il sistema fagocitario, valutando contemporaneamente e nelle loro interazioni i sistemi umorali e quelli cellulari. Le condizioni adottate tendono infatti a riprodurre *in vitro* ciò che avviene *in vivo* quando nel sangue o nel focolaio infiammatorio sono presenti particelle estranee, plasma e fagociti.

La piccola quantità di sangue necessaria per eseguire il test "diretto" (meno di 1 ml) permette di estendere l'uso della metodica anche a casi particolari come neonati o pazienti in shock, oppure a casi in cui si voglia effettua-

re un "monitoraggio" della funzione fagocitaria con prelievi successivi nel tempo. Ulteriori vantaggi del nostro metodo sono la sua brevità di esecuzione (disponendo delle soluzioni pronte, o dei materiali liofilizzati e pronti all'uso, si può portare a termine in una mezz'ora) e la semplicità della strumentazione necessaria (un bagno termostato, una centrifuga da tavolo e uno spettrofotometro), che sono alla portata di qualunque laboratorio.

L'esecuzione del test "in due fasi" è più complessa, ma si deve considerare che questa metodica si applica solo nei casi già selezionati, cioè in cui il test "diretto" ha dimostrato l'esistenza di una anomalia della fagocitosi. Mentre quindi il test "diretto" si può considerare un buon test di "screening", quello "in due fasi" fa parte di tutta una serie di indagini tese a definire più precisamente la diagnosi.

In Tabella VI è riportato in forma schematica un confronto tra il test NBT quantitativo ⁹² ed il nostro metodo. Come si vede, il test di misura del superossido, oggetto di questo lavoro, si presenta come una valida alternativa.

Da quanto detto risulta chiaro che il test qui descritto potrebbe divenire un valido ausilio diagnostico per una buona parte dei difetti di funzionalità fagocitaria. In un prossimo lavoro verranno esposti i primi risultati ottenuti con questo metodo sia per quanto riguarda le condizioni di applicabilità e le possibili interferenze, che per quanto riguarda le possibilità di utilizzazione in casi patologici.

Gli Autori ringraziano il Prof. Filippo Rossi e il Prof. Pier Luigi Patriarca per i loro utili suggerimenti.

Tab. VI - Confronto fra il test NBT quantitativo e il test di misura del superossido descritto in questo lavoro

Test NBT quantitativo	Test di misura del superossido
Richiede l'isolamento dei leucociti dal sangue. Sono necessari almeno 10 ml di sangue.	Si esegue con meno di 1 ml di sangue.
Richiede vari passaggi in solventi organici per l'estrazione del formazano (particelle di NBT ridotto) precipitato.	Si legge direttamente la densità ottica del sopranatante.
Non è chiaro il meccanismo di riduzione dell'NBT, nè la stechiometria O_2^- /formazano.	1 mole di O_2^- riduce 1 mole di citocromo c. Quindi si calcola agevolmente il superossido, in base al coefficiente di estinz.
Le particelle di formazano possono venire fagocitate ed interferire con la stimolazione metabolica cellulare.	Il citocromo c non interferisce in alcun modo con il metabolismo cellulare.
L'NBT viene ridotto in alta percentuale anche da cellule non stimolate.	La produzione di superossido da leucociti non attivati è trascurabile.

Bibliografia

1. Stossel T.P.
Phagocytosis
New Engl. J. Med., 290, 717, 774, 833, (1974).
2. Stossel T.P.
Phagocytosis: recognition and ingestion
Semin. Hematol., 12, 83, (1975).
3. Sbarra A.J., Selvaray R.J., Paul B.B., Poskitt P.K.F., Zgliczynski J.R., Mitchell G.W. Jr. and Louis F.
Biochemical, functional and structural aspects of phagocytosis
Int. Rev. Exp. Pathol., 16, 249, (1976).
4. Silverstein S.C., Steinman R.M. and Cohen Z.A.
Endocytosis
Ann. Rev. Biochem., 46, 669, (1977).
5. Ward P.A.
Leukotaxis and leukotactic disorders
Am. J. Pathol., 77, 519, (1974).
6. Wilkinson P.C.
Chemotaxis and Inflammation
Churchill Livingstone, London, (1974).
7. Gallin J.I. and Quie P.G. (Eds).
Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications
Raven Press, New York, (1978).

8. Gigli I. and Nelson R.A., Jr.
Complement dependent immune phagocytosis. I
Requirement for C₁, C₄, C₂, C₃
Exp. Cell. Res., 57, 45, (1968).
9. Lay W.H. and Nussenzweig V.
Receptors for complement on leukocytes
J. Exp. Med., 128, 991, (1968).
10. Quie P.G., Messener P.R. and Williams R.C.
Phagocytosis in subacute bacterial endocarditis. Localization of the primary opsonic site to Fc fragments
J. Exp. Med., 128, 553, (1968).
11. Jasin H.E.
Human heat labile opsonins: evidence for their mediation via the alternate pathway of complement activation
J. Immunol., 109, 26, (1972).
12. Spier S.S. and Hardin J.H.
Ultrastructure, cytochemistry and function of neutrophil leukocyte granules
Lab. Invest., 20, 488, (1969).
13. Bainton D.F.
Sequential degranulation of two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms
J. Cell. Biol., 58, 249, (1973).
14. Baggiolini M., Hirsch J.G. and De Duve C.
Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation
J. Cell. Biol., 40, 529, (1969).
15. Klebanoff S.J. and Hamon C.B.
Role of myeloperoxidase-mediated antimicrobial system in intact leukocytes
J. Reticuloendothel. Soc., 12, 170, (1972).
16. Mc Ripley R.J. and Sbarra A.J.
Role of the phagocyte in host-parasite interactions. XII. Hydrogen peroxide-myeloperoxidase bactericidal system in the phagocyte
J. Bacteriol., 94, 1425, (1967).
17. Babior B.M.
Oxygen dependent microbial killing by phagocytes
New Engl. J. Med., 298, 659, 721, (1978).
18. Sbarra A.J. and Karnovsky M.L.
The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes
J. Biol. Chem., 234, 1355, (1959).
19. Rossi F. and Zatti M.
Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis
Brit. J. Exp. Pathol., 45, 548, (1964).
20. Zatti M., Rossi F. and Patriarca P.
The H₂O₂ production by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis
Experientia, 24, 669, (1968).
21. Babior B.M., Kipnes R.S. and Curnutte J.T.
Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent
J. Clin. Invest., 52, 741, (1973).
22. Dri P., Bellavite P., Berton G. and Rossi F.
Interrelationship between oxygen consumption superoxide anion and hydrogen peroxide formation in phagocytosing guinea pig polymorphonuclear leukocytes
Mol. Cell. Biochem., 23, 109, (1979).
23. Rossi F., Romeo D. and Patriarca P.
Mechanism of phagocytosis-associated oxidative metabolism in polymorphonuclear leukocytes and macrophages
J. Reticuloendothel. Soc., 12, 127, (1972).
24. Patriarca P., Dri P., Kakinuma K., Tedesco F. and Rossi F.
Studies on the mechanism of metabolic stimulation in polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. I. Evidence for superoxide anion involvement in the oxidation of NADPH
Biochim. Biophys. Acta, 385, 380, (1975).
25. Root R.R., Rosenthal A.S. and Balestra D.J.
Abnormal bactericidal, metabolic, and lysosomal function of Chediak-Higashi syndrome leukocytes
J. Clin. Invest., 57, 649, (1972).
26. Miller M.E., Oski F.A. and Harris M.B.
Lazy-leucocyte syndrome. A new disorder of neutrophil function
Lancet, 1, 665, (1971).
27. Klebanoff S.J. and Clark R.A.
Iodination by human polymorphonuclear leukocytes: A reevaluation
J. Lab. Clin. Med., 89, 675, (1977).
28. Alper C.A., Stossel T.P. and Rosen F.S.
Genetic defects affect complement and host resistance to infection. In: *The Phagocytic Cell in Host Resistance* J.A. Bellanti and D.H. Dayton (Eds.), Raven Press, New York, p. 127, (1975).
29. Johnston R.B., Newmann S.L. and Struth A.G.
An abnormality of the alternate pathway of complement activation in sickle cell disease
New Engl. J. Med., 288, 803, (1973).
30. Reed W.P., Davidson M.S. and Williams R.C., Jr.
Complement system in pneumococcal infections
Infect. Immun., 13, 1120, (1976).
31. Alper C.A., Abramson N., Johnston R.B., Jr, Jandl J.H. and Rosen F.S.
Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement mediated functions and of the third component of complement (C3)
New Engl. J. Med., 282, 349, (1970).
32. Alper C.A., Bloch K.J. and Rosen F.S.
Increased susceptibility to infection in a patient with type II essential hypercatabolism of C3
New Engl. J. Med., 288, 601, (1973).
33. Miller M.E. and Nilsson U.R.
A familial deficiency of the phagocytosis-enhancing activity of serum related to a dysfunction of the fifth component of complement (C5)
New Engl. J. Med., 282, 354, (1970).
34. Boyer J.T., Gall E.P., Norman M.E., Nilsson U.R. and Zimmerman T.S.
Hereditary deficiency of the seventh component of complement
J. Clin. Invest., 56, 905, (1975).
35. Forman M.L. and Stiehm E.R.
Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low-birth-weight infants
N. Engl. J. Med., 281, 926, (1969).
36. Miller M.E.
Phagocytosis in the newborn infant: Humoral and cellular factors
J. Pediatr., 74, 255, (1969).
37. Mc Cracken G.H., Jr. and Eichenwald H.F.

- Leukocyte function and the development of opsonic and complement activity in the neonate
Amer. J. Dis. Child., 121, 120, (1971).
38. Mc Duffie F.C. and Brumfield H.W.
 Effect of rheumatoid factor on complement-mediated phagocytosis
J. Clin. Invest., 51, 3007, (1972).
 39. Jasin H.E., Orozco J.H. and Ziff M.
 Serum heat-labile opsonin in systemic lupus erythematosus
J. Clin. Invest., 53, 343, (1974).
 40. Bjornson A.B. and Alexander J.W.
 Alterations of serum opsonins in patients with severe thermal injury
J. Lab. Clin. Med., 83, 372, (1974).
 41. Alexander J.W., Mc Clellan M.A., Ogle C.K. and Ogle J.D.
 Consumptive opsoninopathy: Possible pathogenesis in lethal and opportunistic infections
Ann. Surg., 184, 672, (1976).
 42. Berendes H., Bridges R.A. and Good R.A.
 A fatal granulomatosis of childhood. The clinical study of a new syndrome
Min. Med., 40, 309, (1957).
 43. Homes B., Page A.R. and Good R.A.
 Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function
J. Clin. Invest., 46, 1422, (1967).
 44. Curnutte J.T., Whritten D.M. and Babior B.M.
 Defective leukocyte superoxide production in chronic granulomatous disease
New Engl. J. Med., 290, 593, (1974).
 45. Rodey G.E., Park B.H., Ford D.K., Holmes-Gray B. and Good R.A.
 Defective bactericidal activity of peripheral blood leukocytes in lipochrome istiocytosis
Amer. J. Med., 49, 322, (1970).
 46. Johnston R.B. and Newman S.L.
 Chronic granulomatous disease
Pediatr. Clin. North Am., 24, 365, (1977).
 47. Cooper M.R., De Chatelet L.R., Mc Call L.E., La Via M.F., Spurr C.L. and Baehner R.L.
 Leukocyte G6PD deficiency
Lancet, II, 110, (1970).
 48. Cooper M.R., De Chatelet L.R., Mc Call L.E., La Via M.F., Spurr C.L. and Baehner R.L.
 Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity
J. Clin. Invest., 51, 769, (1972).
 49. Baehner R.L., Johnston R.B., Jr. and Nathan D.G.
 Comparative study of the metabolic and bactericidal characteristics of severely glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient polymorphonuclear leukocytes and leukocytes from children with chronic granulomatous disease
J. Reticuloendothel. Soc., 12, 150, (1972).
 50. Cohen R., Grush O. and Kauder E.
 Studies of bactericidal activity and metabolism of the leukocyte of full-term neonates
J. Pediatr., 75, 400, (1969).
 51. Anderson D.C., Pickening L.K. and Feigin R.D.
 Leukocyte function in normal and infected neonates
J. Pediatr., 85, 420, (1974).
 52. Miller M.E.
 Host defenses in human neonate
Pediatr. Clin. North Am., 24, 413, (1977).
 53. Moroni M., Capsoni F., Caredda F., Lazzarin A. e Besana C.
 Dimostrazione di un difetto granulocitario in soggetti anziani e correlazione con la presenza di autoanticorpi
Boll. Ist. Sieroter. Milan., 55, 317, (1976).
 54. Holmes B., Park B.H., Malawista S.E., Quie P.G., Nelson D.L. and Good R.A.
 Chronic granulomatous disease in females. A deficiency of leukocyte glutathione peroxidase
New Engl. J. Med., 283, 217, (1970).
 55. Kretschmer R.R., Lopez-Osuna M., De la Rosa L. and Armendares S.
 Leukocyte function in Down's syndrome. Quantitative NBT reduction and bactericidal capacity
Clin. Immunol. Immunopathol., 2, 449, (1974).
 56. Costello C. and Webber A.
 White cell function in Down's syndrome
Clin. Genet., 9, 603, (1976).
 57. Farid N.R., Au B., Woodford G. and Chandra R.K.
 Polymorphonuclear leukocyte function in hypothyroidism
Horm. Res., 7, 247, (1976).
 58. Shousa S. and Kamel K.
 Nitroblue tetrazolium test in children with Kwashiorkor with a comment on the use of latex particles in the test
J. Clin. Pathol., 25, 494, (1972).
 59. Selvaray R.J. and Bath K.S.
 Metabolic and bactericidal activities of leukocytes in protein-calorie malnutrition
Am. J. Clin. Nutr., 25, 166, (1972).
 60. Shilotri P.G.
 Hydrogen peroxide production by leukocytes in protein-calorie malnutrition
Clin. Chim. Acta, 71, 511, (1976).
 61. Hakim J., Cramer E., Auclair C., Gougerot M.A., Feliu E. and Boivin P.
 Acquired functional defect by human blood polymorphonuclears. In: Movement, metabolism and bactericidal mechanisms of phagocytes
 Rossi F., Patriarca P. and Romeo D. (Eds.), Piccin Medical Books, Padua and London p. 375, (1977).
 62. Chandra R.K.
 Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency
Arch. Dis. Child., 48, 864, (1973).
 63. Chandra R.K. and Saraya A.K.
 Impaired immunocompetence associated with iron deficiency
J. Pediatr., 86, 899, (1975).
 64. Curreri P.W., Heck E.L., Brown L. and Baxter C.R.
 Stimulated nitroblue tetrazolium test to assess neutrophil anti-bacterial function: prediction of wound sepsis in burned patients
Surgery, 74, 6, (1973).
 65. Heck E.L., Brown L., Curreri P.W. and Baxter C.R.
 Evaluation of leukocyte function in burned individuals by *in vitro* oxygen consumption
J. Trauma, 15, 486, (1975).
 66. Corberand J., De Lazzard B., Amiques H., Fontanilles A.M. and Gleizes B.
 Reduction du nitrobleu du tetrazolium et polyarthrites rhumatoïdes
Nouv. Presse Med., 4, 430, (1975).

- 10
67. Wenger M.E. and Bole G.G.
Nitroblue tetrazolium dye reduction by peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients measured by a histochemical and spectrophotometric method
J. Lab. Clin. Med., 82, 513, (1973).
 68. Pickering L.K., Anderson D.C., Choi S. and Feigin R.D.
Leukocyte function in children with malignancies
Cancer, 35, 1365, (1975).
 69. Selvaraj R.J., Mc Ripley R.J. and Sbarra A.J.
The metabolic activities of leukocytes from lymphoproliferative and myeloproliferative disorders during phagocytosis
Cancer Res., 27, 2287, (1967).
 70. Strauss R.R., Paul B.B. Jacobs A.A., Simmons C. and Sbarra A.J.
The metabolic and phagocytic activities of leukocytes from children with acute leukemia
Cancer Res., 30, 480, (1970).
 71. Whittaker J.A., Khurshid M. and Hughes H.R.
Neutrophil function in chronic granulocytic leukemia before and after busulphan treatment
Brit. J. Haematol., 28, 541, (1974).
 72. Wantzin G.L. and Wantzin J.
NBT test: erratic behaviour in acute leukemia
Blut, 31, 133, (1975).
 73. Selvaraj R.J., Mc Ripley R.J. and Sbarra A.J.
The effect of phagocytosis and X - irradiation on human leukocyte metabolism
Cancer Res., 27, 2280, (1967).
 74. Selvaraj R.J. and Sbarra A.J.
Effects of X - irradiation on the metabolic changes accompanying phagocytosis
Nature, 210, 158, (1966).
 75. Turcu G. and Albu A.S.
Respiratory capacity at rest and during phagocytosis of rat polymorphonuclear leukocytes under various conditions of irradiation
Int. J. Radiat. Biol., 12, 505, (1967).
 76. Miller D.R. and Kaplan H.G.
Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone
Pediatrics, 45, 861, (1970).
 77. Mandell G.L., Rubin W. and Hook E.W.
The effect of an NADH oxidase inhibitor (hydrocortisone) on polymorphonuclear leukocyte bactericidal activity
J. Clin. Invest., 49, 1381, (1970).
 78. Chretien J.H. and Garagusi V.
Corticosteroid effect on phagocytosis and NBT reduction by human polymorphonuclear neutrophils
J. Reticuloendothel. Soc., 11, 358, (1971).
 79. Holmes B. and Good R.A.
Laboratory models of chronic granulomatous disease
J. Reticuloendothel. Soc., 12, 216, (1972).
 80. Dale D.C., Fauci A.S. and Wolff S.M.
Alternate-day prednisone: leukocyte kinetics and susceptibility to infections
New Engl. J. Med., 291, 1154, (1970).
 81. Lehrer R.I.
Inhibition by sulphonamides of the candidacidal activity of human neutrophils
J. Clin. Invest., 50, 2498, (1971).
 82. Strauss R.R., Paul B.B. and Sbarra A.J.
Effect of phenylbutazone on phagocytosis and intracellular killing by guinea pig polymorphonuclear leukocytes
J. Bacteriol., 96, 1982, (1968).
 83. Malawista S.E. and Bodel P.T.
The dissociation by colchicine of phagocytosis from increased oxygen consumption in human leukocytes
J. Clin. Invest., 46, 786, (1967).
 84. Rubinstein A., Pellet B.
False-negative NBT tests due to transient malfunction of neutrophils
Lancet, I, 382, (1973).
 85. Van der Meer J.W.M., van Zwet T.L. and van Furth R.
New familial defect in microbicidal function of polymorphonuclear leukocytes
Lancet, II, 630, (1975).
 86. Weening R.S., Roos D., Weemaes C.M.R., Homan-Muller J.W.T. and van Schaik M.L.J.
Defective initiation of the metabolic stimulation in phagocytizing granulocytes: a new familial defect
J. Lab. Clin. Med., 88, 757, (1976).
 87. Rebeck J.W. and Crowley J.H.
A method of studying leukocytic function in vivo
Ann. NY Acad. Sci., 59, 757, (1955).
 88. Boyden S.
The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes
J. Exp. Med., 115, 453, (1962).
 89. Patriarca P., Cramer R. e Zabucchi G.
Studio della funzione fagocitaria in condizioni normali e patologiche
Proc. 5th Int. Symp. on Clin. Enz., Part. II, p. 509, (1973).
 90. Kensch G.T., Douglas S.D., Mildvan D. and Hirschman S.Z.
¹⁴C-glucose oxidation in whole blood: a clinical assay for phagocyte dysfunction
Infect. Immun., 5, 414, (1972).
 91. Takeshige K., Matsumoto T., Shibata R. and Minakami S.
Simple and rapid method for the diagnosis of chronic granulomatous disease measuring hydrogen peroxide and superoxide anions released from leukocytes in whole blood
Clin. Chim. Acta, 92, 329, (1979).
 92. Baehner R.L. and Nathan D.G.
Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease
New Engl. J. Med., 278, 971, (1968).
 93. Baehner R.L. and Nathan D.G.
Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease
Science, 155, 835, (1967).
 94. Segal A.W. and Levi A.J.
The mechanism of the entry of dye into neutrophils in the nitroblue tetrazolium (NBT) test
Clin. Sci. Mol. Med., 45, 817, (1973).
 95. Segal A.W. and Levi A.J.
Cell damage and dye reduction in the quantitative nitroblue tetrazolium (NBT) test
Clin. Exp. Immunol., 19, 309, (1975).
 96. Cocchi P., Bartolozzi L. e Ravina A.
Il test NBT in pediatria
Recent Prog. Med., 61, 219, (1976).
 97. Curnutte J.T., Whritten D.M. and Babior B.M.
Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease
New Engl. J. Med., 290, 593, (1974).