

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

DOMENICO MANCINO, ELIO BRESCIANO

**Indagini sull'attività adiuvante di materiali silicei. I.  
Effetti di una silice amorfa sulla produzione di  
anticorpi contro gamma-globulina bovina, nella cavia**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.6, p. 612-620.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_53\\_6\\_612\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_6_612_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Immunologia.** — *Indagini sull'attività adiuvante di materiali silicei. I. Effetti di una silice amorfa sulla produzione di anticorpi contro gamma-globulina bovina, nella cavia* (\*). Nota di DOMENICO MANCINO e ELIO BRESCIANO, presentata (\*\*) dal corrisp. P. CASELLI.

SUMMARY. — In the present investigations silica ("Aerosil") has been shown to produce adjuvant effect in guinea pigs, when injected subcutaneously at the same time and together with bovine gamma-globulin. Antibodies produced are primarily of the  $\gamma_1$  type.

The adjuvanticity of silica has been shown to be lower than that of Freund's complete adjuvant and higher than that of aluminium gel. Adjuvant effect does not appear when silica and antigen are injected in different subcutaneous sites.

It is suggested that the mechanism of the adjuvant effect of silica could be similar to that postulated for aluminium salts.

La silice viene annoverata tra le sostanze capaci di stimolare la produzione di anticorpi. Tuttavia sull'esistenza e misura di tale capacità adiuvante, come pure sul meccanismo attraverso cui essa si esplica, esistono ancora pareri discordanti.

Tra i dati indicativi di un effetto adiuvante della silice sono da ricordare quelli risultanti dagli esperimenti condotti da Ghiringhelli e Pernis (1958) e da Pernis e Paronetto (1962), con l'impiego di una silice cristallina, la tridimite.

Dati parzialmente contrastanti con quelli surriferiti sono stati ottenuti da esperimenti più recenti condotti da Szabó e coll. (1967) utilizzando, come materiali silicei, una polvere di quarzo, una silice amorfa e soluzioni di acido silicico colloidale. Ne è risultato che la produzione anticorpale non appare influenzata dalla polvere di quarzo, è debolmente incrementata in seguito alla somministrazione della silice amorfa alcuni giorni prima dell'inoculazione dell'antigene, mentre viene inibita dall'inoculazione di grandi dosi di acido silicico colloidale.

Nel caso degli esperimenti condotti con la tridimite (Ghiringhelli e Pernis, 1958; Pernis e Paronetto, 1962), l'effetto adiuvante appariva tanto più evidente quanto più lungo era l'intervallo di tempo intercorso tra la somministrazione della silice e quella dell'antigene e non si manifestava quando silice e antigene venivano inoculati contemporaneamente. Ciò ha fatto supporre che l'effetto adiuvante della silice, in questi casi, fosse una conseguenza di una stimolazione aspecifica dell'attività anticorpopoietica, per cui l'animale

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Patologia Generale dell'Università di Napoli.

(\*\*) Nella seduta del 9 dicembre 1972.

avrebbe reagito con una risposta anticorpale più intensa indipendentemente dal tipo di antigene inoculato.

È giustificato supporre, tuttavia, che per la naturale capacità ad integrare con proteine diverse (Holt e Bowcott, 1954; Holt e Went, 1960), soprattutto con quelle a carica elettrica positiva (Caselli, Mancino e Arienzo, 1967), formando complessi relativamente stabili, come pure per la capacità di indurre reazioni infiammatorie granulomatose, la silice debba essere potenzialmente capace di esercitare un'attività adiuvante per un « effetto deposito » del tipo di quello che si osserva con i sali d'alluminio.

Lo scopo delle presenti indagini è, in primo luogo, quello di valutare sperimentalmente la validità di una tale supposizione e, in secondo luogo, quello di determinare se la silice, quale adiuvante, mostri un'attività selettiva nella stimolazione di particolari forme di risposta immunitaria.

Per tale scopo si sono studiati gli effetti di un materiale siliceo amorfo, a particelle submicroniche, sulla risposta immunologica primaria di cavie contro gamma-globulina bovina, quando tale antigene venga inoculato nel sottocutaneo in stretta associazione con la silice stessa.

Esperimenti paralleli sono stati condotti con animali in cui l'antigene e la silice sono stati inoculati separatamente, in distretti diversi del sottocutaneo, e con animali inoculati con solo antigene, con antigene in adiuvante completo di Freund o con antigene adsorbito a idrossido d'alluminio.

Le risposte anticorpali sono state valutate a mezzo delle tecniche dell'emagglutinazione e dell'emolisi passive, dell'anafilassi cutanea passiva e dell'immunolettroforesi.

Prove preliminari sono state condotte per determinare la capacità adsorbente della silice e dell'idrossido d'alluminio per l'antigene.

#### MATERIALI E METODI

*Sostanze e loro provenienza.* — La gamma-globulina bovina (BGG)<sup>(1)</sup> è un prodotto commerciale della Armour Pharmaceutical Company. Il materiale siliceo (Sil) è rappresentato da una polvere silicea amorfa, denominata « Aerosil », a particelle di dimensioni di 25–50 m $\mu$ , della Ditta Degussa di Francoforte sul Meno. L'adiuvante completo di Freund (FCA) è il prodotto 0638 dei Difco Laboratories. La sospensione di idrossido d'alluminio (Al), preparata per azione di NaOH su allume di potassio, contiene 34 mg di residuo secco per ml. Le soluzioni di BGG e le sospensioni di silice e di idrossido d'alluminio sono state preparate in soluzione fisiologica tamponata con fosfati a pH 7,4 (PBS), costituita da NaCl 0,15 M e buffer di fosfati 0,01 M a pH 7,4.

(1) Le abbreviazioni usate nel contesto della pubblicazione sono derivate dai rispettivi termini in lingua inglese.

*Animali e loro immunizzazione.* - Si sono utilizzate cavie di sesso femminile, del peso medio di g 450.

In un primo esperimento, tre gruppi di 7-10 animali ciascuno sono stati immunizzati rispettivamente con 2 mg di BGG in 1 ml di PBS, con 2 mg di BGG adsorbita a 10 mg di silice (0,5 ml di BGG 4 mg/ml + 0,5 ml di Sil 20 mg/ml) e con 2 mg di BGG in emulsione con FCA (0,5 ml di BGG 4 mg/ml + 0,5 ml di FCA). L'antigene è stato distribuito nei cuscinetti adiposi delle 4 zampe (0,125 ml  $\times$  4) e nel sottocutaneo di 2 distretti del dorso (0,250 ml  $\times$  2). Alla fine di ogni settimana dall'immunizzazione e per 7 settimane si è proceduto al prelievo di circa 1,5 ml di sangue dal plesso retrooculare di ogni animale in anestesia eterea. Alla fine dell'ottava settimana tutti gli animali, in anestesia, sono stati dissanguati fino alla morte per sezione delle carotidi.

In un secondo esperimento, tre gruppi di 14 animali ciascuno sono stati immunizzati rispettivamente con 2 mg di BGG adsorbita a 10 mg di silice (0,1 ml di BGG 20 mg/ml + 0,4 ml di Sil 25 mg/ml), con 2 mg di BGG e 10 mg di silice inoculate in distretti separati (0,5 ml di BGG 4 mg/ml e 0,5 ml di Sil 20 mg/ml), e con 2 mg di BGG adsorbita a 14 mg circa di residuo secco di idrossido d'alluminio (0,1 ml di BGG 20 mg/ml + 0,4 ml di sospensione di Al 34 mg di residuo secco/ml). L'antigene è stato distribuito nei cuscinetti adiposi delle 2 zampe del lato destro (0,125 ml  $\times$  2) e nel sottocutaneo di un distretto del dorso dello stesso lato (0,250 ml  $\times$  1). In siti corrispondenti del lato sinistro, gli animali inoculati con BGG adsorbita a silice o con BGG adsorbita a idrossido d'alluminio hanno ricevuto 0,5 ml di PBS, mentre quelli inoculati con BGG e silice separatamente hanno ricevuto 10 mg di silice in 0,5 ml di PBS. Gli animali di questo secondo esperimento sono stati dissanguati fino alla morte per sezione delle carotidi, in anestesia, alla fine della 4<sup>a</sup> settimana dall'immunizzazione.

Tutti i campioni di siero ottenuti nel corso del 1<sup>o</sup> e del 2<sup>o</sup> esperimento sono stati conservati a  $-20^{\circ}$  C.

*Tecniche per l'analisi dei sieri immuni.* - *L'emagglutinazione passiva (PA)* è stata eseguita con l'impiego di emazie fresche di montone tannate e sensibilizzate con l'antigene, secondo il metodo di Stavitsky e coll. (Stavitsky, 1954; Stavitsky e Arquilla, 1958) adattato ad un sistema di microtitolazione, con volumi di 50  $\mu$ l di diluizioni geometriche dei sieri in ragione 2 a partire da 1 : 10. I titoli emagglutinanti sono stati rappresentati dalla più alta diluizione del siero che determinava una agglutinazione d'intensità ++ (Stavitsky, 1954). *L'emolisi passiva (PL)* è stata effettuata con emazie fresche di montone tannate e sensibilizzate, con volumi di 0,5 ml di diluizioni geometriche dei sieri in ragione 2 a partire da 1 : 10, usando siero fresco di cavie come sorgente di complemento. Il grado di lisi veniva stimato visualmente, considerando come titolo la più alta diluizione del siero con la quale si otteneva ancora la lisi del 100% di emazie. *L'anafilassi cutanea passiva*

(PCA) è stata eseguita secondo il metodo di Ovary (1964) in cavie albine di 250–300 g. *L'immunolettroforesi* (IEF) è stata attuata utilizzando la microtecnica di Scheidegger (1955) su « Difco Noble Agar Special » all'1,5%.

## RISULTATI

### *Emagglutinazione passiva.*

#### a) *Animali inoculati con BGG, BGG adsorbita a silice o BGG in FCA.*

I risultati della titolazione dei campioni di siero ottenuti dagli animali di questo primo esperimento sono riportati sinotticamente nella Tabella I.

TABELLA I

*Titoli emagglutinanti di sieri di cavie immunizzate con BGG, BGG adsorbita a silice (BGG—Sil) o BGG in adiuvante completo di Freund (BGG—FCA).*

GIORNO DEL PRELIEVO	IMMUNIZZAZIONE								
	BGG			BGG—Sil			BGG—FCA		
	N. (1) sieri	Titolo (3)	Oscilla- zione (4)	N. sieri	Titolo	Oscilla- zione	N. sieri	Titolo	Oscilla- zione
7°	0/9 <sup>(2)</sup>	—	—	10/13	46	10–160	10/10	45	10–160
14°	4/9	30	10–80	10/10	55	10–160	10/10	288	160–320
21°	3/8	33	10–80	9/9	206	10–640	10/10	2176	640–5120
28°	3/7	20	10–40	8/8	210	40–640	6/6	7253	2560–10240
35°	3/7	33	10–80	7/7	125	40–320	6/6	5333	1280–10240
42°	2/7	30	20–40	7/7	94	20–320	6/6	2560	1280–5120
49°	2/6	45	10–80	5/6	88	10–320	5/5	3072	1280–5120
56°	2/5	30	20–40	3/5	73	20–160	4/4	2240	1280–2560

(1) La diminuzione del numero dei sieri con il progredire del periodo di immunizzazione è dovuta al sacrificio o alla morte spontanea di alcuni animali.

(2) N° di sieri positivi/N° totale di sieri.

(3) Media aritmetica dei reciproci dei titoli emagglutinanti.

(4) Valori minimo e massimo dei reciproci dei titoli emagglutinanti.

Del gruppo di 9 animali trattati con sola BGG, soltanto 4 hanno dato una risposta anticorpale apprezzabile, con titoli massimi oscillanti tra 1 : 10 e 1 : 80, raggiunti già alla fine della 2<sup>a</sup> settimana. Alla fine della 1<sup>a</sup> settimana nessun siero è risultato positivo. In soli 2 casi la risposta anticorpale è rimasta valutabile sino alla fine dell'8<sup>a</sup> settimana.

Tutti gli animali dei 13 trattati con BGG adsorbita a silice hanno dato una risposta anticorpale, con titoli massimi oscillanti tra 1 : 80 e 1 : 640 raggiunti gradualmente tra la 3<sup>a</sup> e la 6<sup>a</sup> settimana. In 10 animali su 13, tale risposta si è evidenziata sin dalla fine della 1<sup>a</sup> settimana, mentre nei 3 rimanenti è cominciata a poter essere valutata in occasione del 2<sup>o</sup> salasso. Raggiunto il massimo valore, il titolo dei singoli sieri ha cominciato lentamente a decrescere. Alla fine dell'8<sup>a</sup> settimana, in 3 dei 5 animali sopravvissuti sono ancora presenti anticorpi titolabili.

Tutti gli animali dei 10 inoculati con BGG in FCA hanno risposto con una notevole produzione di anticorpi, con titoli massimi oscillanti tra 1 : 2560 e 1 : 10240 esibiti dai campioni di siero prelevati alla fine della 4<sup>a</sup> settimana. La risposta anticorpale è risultata evidente sin dalla fine della 1<sup>a</sup> settimana in tutti gli animali. Nei campioni di siero ottenuti alla fine dell'8<sup>a</sup> settimana, i titoli emagglutinanti dei 4 animali sopravvissuti si sono mantenuti su valori alti, sebbene inferiori a quelli massimi raggiunti in epoca precedente.

b) *Animali inoculati con BGG e silice in distretti separati, con BGG adsorbita a silice o con BGG adsorbita a idrossido d'alluminio.*

I risultati della titolazione dei sieri ottenuti, alla fine della 4<sup>a</sup> settimana, dagli animali di questo secondo esperimento sono riportati nella Tabella II.

TABELLA II

*Titoli emagglutinanti di sieri di cavie immunizzate con BGG e silice inoculate in distretti separati (BGG+Sil), BGG adsorbita a silice (BGG—Sil) o BGG adsorbita ad idrossido di alluminio (BGG—Al).*

IMMUNIZZAZIONE	N. sieri	Titolo (2)	Oscillazione (3)
BGG+Sil . . . . .	5/10 (1)	18	10-40
BGG—Sil . . . . .	13/13	310	40-640
BGG—Al . . . . .	13/13	119	10-320

(1) N° di sieri positivi/N° totale di sieri.

(2) Media aritmetica dei reciproci dei titoli emagglutinanti.

(3) Valori minimo e massimo dei reciproci dei titoli emagglutinanti.

Dei 10 animali trattati con BGG e silice in distretti separati, solo 5 hanno dato una risposta anticorpale, con titoli variabili da 1 : 10 a 1 : 40.

Tutti gli animali dei 13 trattati con BGG adsorbita a silice hanno dato una risposta anticorpale, con titoli oscillanti tra 1 : 40 a 1 : 640.

Parimenti, tutti e 13 gli animali trattati con BGG adsorbita a idrossido d'alluminio hanno prodotto anticorpi, con titoli variabili da 1 : 10 a 1 : 320.

*Emolisi passiva.*

Tutti i campioni di siero prelevati nel corso del 1° e del 2° esperimento sono stati esaminati anche a mezzo della tecnica dell'emolisi passiva. Tuttavia, soltanto in quelli provenienti dagli animali trattati con BGG in FCA è stato possibile mettere in evidenza anticorpi emolizzanti, con titoli massimi oscillanti tra 1 : 640 e 1 : 2560, raggiunti tra la 4<sup>a</sup> e la 5<sup>a</sup> settimana. La presenza di tali anticorpi è risultata evidente sin dalla fine della 3<sup>a</sup> settimana. Alla fine dell'8<sup>a</sup> settimana, i titoli emolizzanti dei 4 animali sopravvissuti si sono mantenuti su valori lievemente inferiori a quelli massimi precedentemente raggiunti.

*Anafilassi cutanea passiva.*

A tale test sono stati sottoposti 3 campioni di siero, tra quelli ottenuti alla fine della 4<sup>a</sup> settimana, per ciascun gruppo di animali del 1° esperimento e 3 campioni di siero per ogni gruppo di animali del 2° esperimento. Sono stati scelti sieri che presentavano, nell'ambito di ciascun gruppo, titoli emagglutinanti diversi.

Ad eccezione di uno dei 3 campioni di siero del gruppo di animali inoculati con sola BGG, tutti i campioni di siero saggiati hanno dato reazioni di PCA, con titoli approssimativamente corrispondenti ai titoli emagglutinanti rispettivi.

*Immunolettroforesi.*

A tale prova sono stati sottoposti i campioni di siero raccolti alla fine della 4<sup>a</sup> settimana dall'inoculazione dell'antigene dai 3 gruppi di animali del 1° esperimento.

Lo sviluppo di archi di precipitazione tra i sieri immuni e la BGG si è avuto soltanto con i campioni di siero provenienti dagli animali immunizzati con l'antigene in FCA. Tali archi di precipitazione sono apparsi nei distretti di migrazione elettroforetica delle globuline  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  e sono quindi chiaramente indicativi della presenza di entrambi i tipi di anticorpi nei sieri esaminati.

## DISCUSSIONE

I risultati delle presenti indagini dimostrano che la silice amorfa sub-micronica («Aerosil»), inoculata nel sottocutaneo di cavie insieme a gamma-globulina bovina, esercita un evidente effetto adiuvante sulla risposta immunitaria, che si manifesta, oltre che con la quantità di anticorpi prodotti, anche con la più precoce comparsa di essi in circolo. Tale effetto adiuvante appare largamente inferiore a quello esercitato dall'adiuvante completo di Freund e significativamente superiore a quello esercitato dall'idrossido di alluminio. L'attività adiuvante della silice non si manifesta quando silice e antigene vengono inoculati in distretti separati.

Appare, pertanto, giustificato supporre che l'adsorbimento dell'antigene alle particelle di silice debba rappresentare una condizione essenziale per l'effettuarsi dell'attività adiuvante della silice e che il meccanismo di tale attività debba essere, per certi aspetti, simile a quello postulato nel caso di altre sostanze adiuvanti, del tipo dei sali di alluminio, le quali agiscono soprattutto per un « effetto deposito » sull'antigene (Glenny, Buttle e Stevens, 1931). I materiali silicei, infatti, per la loro capacità ad interagire con sostanze di varia natura, tra cui le proteine, possiedono la principale qualità che una sostanza deve avere per esercitare un effetto adiuvante attraverso un rallentamento della diffusione dell'antigene, e cioè la capacità di adsorbire l'antigene stesso.

Nel caso della silice, tale capacità adsorbente risulterà condizionata, oltre che dalla qualità della silice stessa, dalla natura dell'antigene, in quanto i materiali silicei tendono ad interagire maggiormente con molecole di carica elettrica prevalentemente positiva.

Nel caso delle presenti indagini, pertanto, per la combinazione silice-proteina usata, la capacità adsorbente del materiale siliceo può esprimersi al meglio, sia per la notevole superficie presentata dalle piccolissime particelle che costituiscono l'« Aerosil », sia per le numerose cariche elettriche positive esibite dalle molecole di gamma-globulina.

L'evidenza di un tale adsorbimento scaturisce dalle prove preliminari, condotte nel corso di queste indagini, da cui è risultato che dei 2 mg di BGG inoculati in ogni animale insieme a 10 mg di silice, ben il 90 % (1° esperimento) o il 96 % (2° esperimento) si trova adsorbito alla silice stessa.

Considerando, inoltre, il ruolo giocato dai macrofagi nella produzione di anticorpi contro antigeni in particelle (Gallily e Feldman, 1967) e tenendo conto che le particelle di silice vengono rapidamente fagocitate da tali cellule (Kessel, Monaco e Marchisio, 1963; Allison, Harington e Birbeck, 1966), un addizionale meccanismo dell'effetto adiuvante della silice potrebbe risiedere nel fatto che con l'adsorbimento della BGG sulla silice stessa, un antigene solubile viene trasformato in uno in particelle facilmente fagocitabili.

I materiali silicei, infine, e tra questi anche l'« Aerosil », possiedono una notevole capacità di indurre reazioni granulomatoze (Ardoino, Lo Monte, Mancino e Matraccia, 1961), il che può rappresentare un ulteriore meccanismo attraverso cui si produce l'effetto adiuvante. È noto, infatti, che nel contesto delle reazioni granulomatoze indotte dai sali d'alluminio e dagli oli minerali usati come adiuvanti, sono presenti numerose cellule anticorpopoietiche il cui contributo alla risposta anticorpale è generalmente sostenuto (Oakley, Batty e Warrack, 1951; White, Coons e Connolly, 1955). Per quanto ciò non sia stato dimostrato, nelle presenti indagini, per le reazioni granulomatoze indotte dal materiale siliceo, è presumibile che un contributo alla risposta immunitaria possa essere dato anche da queste reazioni.

Un meccanismo dell'effetto adiuvante dei materiali silicei diverso da quello presentemente postulato è stato sostenuto in passato da altri autori (Ghiringhelli e Pernis, 1958; Pernis e Paronetto, 1962) in seguito ad indagini

condotte in condizioni sperimentali ben diverse dalle presenti. In quei casi, un materiale siliceo cristallino veniva somministrato in notevoli dosi per via endovenosa e l'effetto adiuvante risultava più evidente quanto più lungo era il lasso di tempo intercorso tra l'inoculazione della silice e quella dell'antigene. Tali risultati sono stati considerati indicativi di un effetto adiuvante della silice quale conseguenza di una stimolazione aspecifica dell'attività anticorporea, attraverso la liberazione di sostanze dai macrofagi danneggiati dalla silice stessa.

I risultati delle presenti indagini non escludono che la silice possa esercitare, in certi casi, effetti adiuvanti con un tale meccanismo, tuttavia tendono ad escludere che un simile meccanismo possa giocare un ruolo preminente anche in condizioni sperimentali simili a quelle presentemente usate. Nelle indagini da noi condotte l'attività adiuvante della silice non si è manifestata quando tale materiale è stato inoculato in un distretto diverso da quello usato per la somministrazione dell'antigene.

Per mettere in evidenza se la silice, quale adiuvante, mostri un'attività selettiva stimolando la produzione di particolari tipi di anticorpi, campioni di siero sono stati analizzati a mezzo delle tecniche dell'emolisi passiva, dell'anafilassi cutanea passiva e dell'immunolettroforesi, allo scopo di valutare il tipo di immunoglobuline,  $\gamma_1$  o  $\gamma_2$ , presenti tra gli anticorpi specifici. Tali due tipi di immunoglobuline nella cavia, come è noto, differiscono l'uno dall'altro non solo per la mobilità elettroforetica (Benacerraf, Ovary, Bloch e Franklin, 1963) ma anche per le proprietà biologiche, essendo le  $\gamma_1$  capaci di sensibilizzare l'animale omologo per l'anafilassi cutanea passiva (Ovary, Benacerraf e Bloch, 1963) e le  $\gamma_2$  capaci di fissare il complemento e di dare quindi emolisi (Bloch, Kourilsky, Ovary e Benacerraf, 1963).

Per quanto con la tecnica di microimmunolettroforesi da noi usata non sia stato possibile evidenziare il tipo di immunoglobuline presenti nei sieri degli animali inoculati con silice e BGG, per la insufficiente quantità di anticorpi presenti, la positività delle reazioni di PCA e la negatività di quelle di lisi passiva, tendono a dimostrare, nei sieri stessi, la presenza di anticorpi di tipo  $\gamma_1$  e, nei limiti consentiti dalla sensibilità delle reazioni di emolisi, l'assenza di anticorpi di tipo  $\gamma_2$ .

Pertanto, anche per la qualità del suo effetto adiuvante, la silice, con le modalità usate nelle presenti indagini, si comporta in maniera simile a quegli adiuvanti che agiscono principalmente per un «effetto deposito» sull'antigene, e cioè stimolando soprattutto, nella cavia, la produzione di anticorpi di tipo  $\gamma_1$ .

#### BIBLIOGRAFIA

- ALLISON A. C., HARINGTON J. S. e BIRBECK M., « J. Exp. Med. », 124, 141 (1966).  
 ARDOINO L. A., LO MONTE G., MANCINO D. e MATRACIA S., « Arch. de Vecchi », 35, 439 (1961).  
 BENACERRAF B., OVARY Z., BLOCH K. J. e FRANKLIN E. C., « J. Exp. Med. », 117, 937 (1963).  
 BLOCH K. J., KOURILSKY F. M., OVARY Z. e BENACERRAF B., « J. Exp. Med. », 117, 965 (1963).

- CASELLI P., MANCINO D. e ARIENZO R., « Folia Medica », 50, 749 (1966).
- GALLILY R. e FELDMAN M., « Immunology », 12, 197 (1967).
- GHIRINGHELLI L. e PERNIS B., « Med. Lavoro », 49, 665 (1958).
- GLENNY A. T., BUTTLE G. A. H. e STEVENS M. F., « J. Path. Bact. », 34, 267 (1931).
- HOLT P. F. e BOWCOTT J. E. L., « Biochem. J. », 57, 471 (1954).
- HOLT P. F. e WENT C. W., « Brit. J. Indust. Med. », 17, 25 (1960).
- KESSEL R. W. I., MONACO L. e MARCHISIO M. A., « Brit. J. Exp. Path. », 44, 351 (1963).
- OAKLEY C. L., BATTY I. e WARRACK H. G., « J. Path. Bact. », 63, 33 (1951).
- OVARY Z., in « Immunological Methods, C.I.O.M.S. Symposium », Ed. J. F. Ackroyd, p. 259. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1964.
- OVARY Z., BENACERRAF B. e BLOCH K. J., « J. Exp. Med. », 117, 951 (1963).
- PERNIS B. e PARONETTO F., « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 110, 390 (1962).
- SCHEIDEGGER J. J., « Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. », 7, 103 (1955).
- STAVITSKY A. B., « J. Immunol. », 72, 360 (1954).
- STAVITSKY A. B. e ARQUILLA E. R., « Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. », 13, 1 (1958).
- SZABÓ ST., CSÖGÖR ST., LÁSZLÓ I. e ADORJÁN E., « Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. », 26, 519 (1967).
- WHITE R. G., COONS A. H. e CONNOLLY J. M., « J. Exp. Med. », 102, 73 (1955).