

25. CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELL'IMMUNITÀ DELL'INFEZIONE MALARICA.

Fin dal 1896 Celli (1) tentò di dimostrare la presenza di sostanze protettive contenute nel sangue di malarici cronici, senza riuscire però nel suo intento. Egli inoculò con sangue infetto di *P. vivax* un individuo sano, il quale, prima e dopo questa inoculazione sperimentale, ricevette in complesso 135 cc. di siero proveniente da malarici guariti. Nonostante questo siero, l'infezione malarica si sviluppò all'undicesimo giorno. Analogo comportamento osservò il Celli in un altro individuo sano mediante l'inoculazione del sangue infetto di *P. vivax*, malgrado il soggetto venisse trattato con 150 cc. di siero di malarici guariti. Schimert (1917) (2) e Serioli (1924) (4) eseguirono ripetute iniezioni di autosiero in malarici acuti, senza constatare altro beneficio curativo all'infuori di un miglioramento delle condizioni generali. Seyfarth (1920) (3) in casi acuti di malaria praticò iniezioni di 5-15 cc. di siero inattivato di malarici, senza risultati. A loro volta Taliaferro e Taliaferro (1929) (6), sperimentando su canarini, e Nauck e Malamos (1935) (12), sperimentando su scimmie, a cui iniettavano siero immune, sia prima, che contemporaneamente e dopo l'inoculazione dei parassiti, non riuscirono a dimostrare una azione protettiva contro l'infezione provocata.

D'altra parte, le osservazioni di altri autori sembrano invece indicare, che il siero di malarici cronici contenga sostanze specifiche immuni, capaci di esercitare una azione protettiva nei soggetti normali, sperimentalmente inoculati o infetti naturalmente. Nella valutazione di questi risultati bisogna però tenere presente il fatto che nella malaria indotta e nelle recidive si possono avere una certa percentuale di guarigioni spontanee.

Sotiriades (1917) (13), iniettando siero di malarici cronici in malarici acuti, ottenne buoni risultati curativi, sia sugli accessi febbrili come sulla evoluzione generale della malattia. L'infezione era dovuta a *P. vivax*. Nelle sue successive ricerche (1936), compiute a Berlino, i primi risultati vennero riconfermati: l'iniezione di sangue o siero di paralitici malarico-

terapizzati e guariti dalla malaria, in altri paralitici con malaria in atto, determinò generalmente la remissione della febbre; l'iniezione di sangue o siero di malarici cronici, con splenomegalia, in malarici infettatisi naturalmente e con febbre in atto, determinò l'abbassamento della febbre e la diminuzione del numero dei parassiti nel sangue periferico. Kauders (1927) ⁽⁵⁾, trattando 12 paralitici con malaria indotta in atto con siero di un paziente che era stato difficile infettare sperimentalmente, osservò la scomparsa della febbre in 9 soggetti. Radosawljevic (1930) ⁽⁶⁾, sperimentando su pazienti con malaria indotta, e Sabatini (1930) ⁽⁷⁾, in malarici naturalmente infetti da *P. vivax* e *P. malariae*, iniettando siero di malarici guariti in pazienti con forme corrispondenti di malaria in atto, osservarono pure la scomparsa della febbre e dei parassiti presenti prima in circolo. Neumann (1933) ⁽⁸⁾, nel nostro Centro di malarioterapia a Roma, ha potuto anche dimostrare la comparsa di anticorpi parassiticidi nel sangue dei pazienti sperimentalmente infettati con *P. vivax*; dimostrò inoltre che un siero contenente gli anticorpi contro i parassiti è inattivo invece contro gli sporozoit della stessa specie parassitaria. Koressios (1933) ⁽¹⁰⁾, usando siero di conigli più volte inoculati con sangue infetto da *P. vivax*, osservò che l'iniezione di questo siero eterologo in pazienti sperimentalmente infettati con *P. vivax* determinava la scomparsa degli accessi febbrili. Findlay e Brown (1934) ⁽¹¹⁾, sperimentando su canarini, poterono dimostrare una debole azione protettiva solo somministrando grandi quantità di siero immune in infezioni provocate con un numero molto basso di parassiti.

Queste osservazioni discordi, e la possibilità di poter disporre di un gruppo di *Macacus rhesus*, affetti da infezione cronica da *P. knowlesi*, mi indussero ad eseguire alcune ricerche, per studiare il comportamento dell'infezione malarica acuta rispetto ad un trattamento con siero immune.

La prima ricerca fu fatta nel giugno 1935; le successive dovettero essere sospese per l'insorgenza nei *Macacus rhesus* di infestazioni da *Oesophagostomum*, e l'indagini poterono essere riprese soltanto nel luglio 1937. Dalla prima serie di indagini, riassunte nella tabella I, si poteva già dimostrare la formazione di anticorpi protettivi nel siero delle scimmie durante l'infezione malarica sperimentale. Questi risultati vennero, nel frattempo, confermati nel successivo agosto dal lavoro di Goggeshall e Kumm (1937) ⁽¹⁴⁾.

TABELLA I.

Sommario dei risultati ottenuti in MACACUS RHESUS, sperimentalmente inoculati con P. KNOWLES, e trattati con siero immune e siero normale.

N. Scimmie	GIORNI DI OSSERVAZIONE																						Osservazioni
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Data di inoculazione	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	cc. Siero	% Parasiti	
1	0	0	+ 10	2 10	8 10	6 10	11 10	28 10	19	37 † 68													
2 ^c	0	0	+	4	14	57 † 70																	
3	0	0	0 10	+ 10	1 10	2 10	1 10	6 10	21 10	8	3	4	2	3	1	+	2	+	+	+	+	+	
4	0	0	0 5	+ 5	3 5	2 5	6 5	9 5	18 5	26 5	26 5	36 5	34 5	47 †									
5 ^c	0	0	0 10	+ 10	3 10	9 10	12 10	18 10	36 † 64														
6 ^c	0	0	0 5	+ 5	4 5	10 5	21 5	56 † 73															
7	0	0	0	0	0 10	+ 10	+ 10	+ 10	+ 10	1 10	2 10	1 10	7 10	10	+	2	1	3	1	+	2	+	
8	0	0	0	0	0	0	0 5	+ 5	2 5	1 5	4 5	7 5	11 4	5 13	5 6	3 5	4 1	3 1	3 1	3 1	3 1	+	
9	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0	5 2	5 1	5 3	5 10	5 26	5 48 † 60											
10	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0	1	4	2	9	6 10	20	8	5	5	2	1	3	1	+	
11 ^c	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0	10 0	10 5	10 29	52 † 76														
12	0	0	0	0	+	+	4 60	14		26	51 †												
13	0	0	0	0	+	+	4	15 60	28	40 61 †													
14 ^c	0	0	0	0	+	+	3	12 60	31 † 68														

c = controlli trattati con siero di scimmie normali. + = sangue positivo. † = morto.

Materiale e tecnica.

L'infezione malarica venne provocata nei *Macacus rhesus* mediante inoculazioni di sangue infetto, usufruendo di un ceppo di *P. knowlesi*, proveniente nel 1934 dalla London School of Hygiene and Tropical Medicine, e mantenuto in vita nel nostro laboratorio con passaggi successivi nelle scimmie a mezzo sangue.

Il siero immune venne raccolto da *Macacus rhesus* con infezione malarica di varia durata; il periodo di tempo trascorso tra l'ultimo intervento curativo e la raccolta del sangue varia tra quattro e dieci mesi. Il trattamento dell'attacco primitivo e quello delle varie recidive venne praticato in alcune scimmie con chinina, in altre con atebrina, in altre ancora con italchina. Per poter disporre di grandi quantità di siero, gli animali vennero dissanguati sotto narcosi, raccogliendo tutto il sangue dalla carotide. Le iniezioni di siero furono fatte generalmente per via endovenosa, ad eccezione di un caso in cui il siero venne iniettato per via intraperitoneale. Le dosi di siero inoculate ed i giorni di somministrazione sono riportati nella tabella I.

I *Macacus rhesus* usati per le indagini vennero infettati con inoculazioni per via endovenosa di sangue citratato, contenente un numero conosciuto di parassiti. In tutte le scimmie, dopo l'iniezione infettante, ogni giorno venne esaminato il sangue per la ricerca dei parassiti nel sangue periferico, per tutto il periodo di osservazione.

Le ricerche fatte furono dirette a studiare:

- a) l'efficacia del siero immune somministrato alla fine del periodo di incubazione;
- b) l'efficacia del siero immune somministrato contemporaneamente all'iniezione infettante;
- c) l'efficacia del siero immune iniettato in dosi massive, con presenza di parassiti nel sangue periferico in percentuali superiori al 10 %.

a) EFFICACIA DEL SIERO SOMMINISTRATO ALLA FINE DEL PERIODO DI INCUBAZIONE.

Prima ricerca. — Due *Macacus rhesus* normali, n. 1 e 2, vennero inoculati per via endovenosa con 2 cc. di sangue citratato, con il 39 % di

globuli rossi parassitati. I primi parassiti comparvero nel sangue periferico tre giorni dopo l'inoculazione. La scimmia n. 1 ricevette, iniziando dal terzo giorno di malattia, 10 cc. di siero immune per 7 giorni consecutivi, mentre la scimmia n. 2, tenuta quale controllo, non venne trattata. Ambedue le scimmie presentarono una infezione a decorso acuto; però mentre il controllo morì al 7° giorno di malattia, la scimmia trattata presentò una infezione con un decorso più prolungato, morendo all' 11° giorno.

Seconda ricerca. — Venne ripetuta la prima indagine con siero immune di differenti scimmie croniche, ma con controlli trattati invece con siero normale di scimmia. Quattro *Macacus rhesus*, n. 3, 4, 5 e 6, vennero inoculati per via endovenosa con 2 cc. di sangue citratato, con il 28% di globuli rossi parassitati. Alla comparsa dei primi parassiti nel sangue periferico al terzo giorno di malattia, alla scimmia n. 3 vennero iniettati 10 cc. di siero immune, alla scimmia n. 4 vennero iniettati 5 cc. di siero immune, ripetendo il trattamento nei giorni successivi per 8 e rispettivamente 11 giorni. Le scimmie n. 5 e 6, quali controlli, vennero trattate rispettivamente con 10 e 5 cc. di siero normale per tutto il periodo della infezione. Mentre l'infezione nelle due scimmie trattate con siero normale manifestò subito una evoluzione acuta, raggiungendo percentuali alte di globuli rossi parassitati, e provocando la morte rispettivamente dopo 8 e 9 giorni dall'inoculazione, nella scimmia n. 3, trattata con siero immune, venne evitata la morte e l'infezione da acuta si modificò in una forma cronica, senza altri interventi medicamentosi; la scimmia vive tuttora. La scimmia n. 4, pure trattata con siero immune, ma in dosi giornaliere inferiori, presentò un'infezione acuta a decorso prolungato, morendo al 15° giorno di malattia.

Terza ricerca. — Differisce dalle precedenti indagini solo in quanto l'infezione venne provocata con un numero relativamente basso di parassiti, e non si usò scimmie di controllo. Due *Macacus rhesus* normali, n. 7 e 8, vennero inoculati con $\frac{1}{2}$ cc. di sangue citratato, con il 2% di globuli rossi parassitati. La scimmia n. 7 ricevette, dal giorno di comparsa dei parassiti nel sangue periferico, 10 cc. di siero immune per 8 giorni consecutivi, la scimmia n. 8 ricevette 5 cc. di siero immune per 12 giorni. In ambedue le scimmie il periodo di incubazione fu di 6 giorni e l'infezione presentò un decorso acuto all'inizio, poi cronico, con un numero limitato di parassiti in circolo; senza altri interventi medicamentosi, le due scimmie sono a tutt'oggi viventi.

I risultati ottenuti nelle prime tre ricerche sembrano indicare che il siero di *Macacus rhesus* con infezione malarica cronica da *P. knowlesi* dimostra una evidente azione sul decorso dell'infezione sperimentalmente provocata con ceppo omologo; in alcune scimmie viene evitata la morte e l'infezione da acuta si modifica in un'infezione cronica, in altre, invece, il decorso acuto dell'infezione viene soltanto prolungato rispetto a quello normale. Si può dedurre inoltre che il siero immune, mentre presenta una efficacia talvolta appena percettibile contro infezioni provocate da altissime dosi di parassiti, può determinare invece una più evidente azione protettiva contro infezioni causate da un numero relativamente basso di parassiti.

b) EFFICACIA DEL SIERO IMMUNE SOMMINISTRATO CONTEMPORANEAMENTE
ALL'INIEZIONE INFETTANTE.

Quarta ricerca. — Tre *Macacus rhesus* normali, n. 9, 10 e 11, vennero inoculati con $\frac{1}{2}$ cc. di sangue citratato, con il 2,5 % di globuli rossi parassitati. La scimmia n. 9 ricevette giornalmente, iniziando dal giorno dell'inoculazione, per un periodo di 12 giorni, 5 cc. di siero immune, la scimmia n. 10 per 8 giorni, 10 cc. di siero immune, e la scimmia n. 11, quale controllo, 10 cc. di siero normale per 8 giorni consecutivi. La scimmia di controllo presentò un'infezione acuta e morì 10 giorni dopo l'inoculazione, con una percentuale di globuli rossi parassitati del 76 %; la scimmia n. 10, trattata complessivamente con 60 cc. di siero immune, presentò un'infezione acuta a più lungo decorso, morendo al 13° giorno di malattia, con una percentuale di globuli rossi parassitati del 60 %; la scimmia n. 9, trattata complessivamente con 80 cc. di siero immune, dimostrò invece un'infezione acuta più benigna, modificatasi in una forma cronica; la scimmia vive tuttora, senza aver ricorso ad altri interventi medicamentosi.

I risultati ottenuti, mentre confermano l'azione protettiva del siero immune contro l'infezione sperimentalmente provocata, non permettono invece di stabilire il periodo più favorevole per la somministrazione del siero immune, nell'intento di raggiungere la massima protezione; le scimmie trattate già durante il periodo di incubazione non sembrano dimo-

strare una maggiore resistenza all'infezione di quelle trattate ad infezione in atto. Nel valutare i risultati ottenuti bisogna tenere presente, oltre ad un fattore di sensibilità individuale, la possibilità che la concentrazione delle sostanze protettive specifiche nel siero dei vari animali con infezione malarica cronica sia diversa.

c) EFFICACIA DEL SIERO IMMUNE INIETTATO IN DOSI MASSIVE, CON PRESENZA DI PARASSITI NEL SANGUE PERIFERICO IN PERCENTUALI SUPERIORI AL 10 %.

Quinta ricerca. — Tre *Macacus rhesus* normali, n. 12, 13 e 14, vennero inoculati con $\frac{1}{2}$ cc. di sangue citratato, con il 5 % di globuli rossi parassitati. Alla scimmia n. 12, vennero iniettati 60 cc. di siero immune all'8° giorno di malattia, presentando una percentuale di globuli rossi parassitati del 14 %; la scimmia n. 13 ricevette, pure all'8° giorno di malattia, 60 cc. di siero immune, ed altri 40 cc. al 10° giorno, presentando una percentuale di globuli rossi parassitati rispettivamente del 28 e 61 %; alla scimmia n. 14, tenuta quale controllo, vennero iniettati 60 cc. di siero normale, avendo una percentuale di globuli rossi parassitati del 31 %. I risultati ottenuti furono i seguenti: la scimmia n. 13, trattata con 60 cc. di siero immune, morì all'11° giorno di malattia, la scimmia n. 14, trattata complessivamente con 100 cc. di siero immune, al 10° giorno; la scimmia di controllo, trattata con 60 cc. di siero normale, morì al 9° giorno di malattia.

Dai risultati conseguiti si può dedurre che le dosi massive di siero immune, praticate nel periodo in cui la percentuale dei globuli rossi parassitati ha raggiunto valori abbastanza elevati, non offrono una apprezzabile protezione, o quasi, contro l'infezione in atto; il decorso dell'infezione più prolungato di 2-3 giorni rispetto a quello osservato nella scimmia di controllo, può essere causato, almeno in parte, al differente grado di sensibilità individuale verso l'infezione. Le dosi massive di siero immune hanno rivelato, invece, una evidente azione antitossica: le due scimmie trattate con siero immune non hanno presentato il noto quadro tossico generale delle infezioni gravi, ma sino quasi alla fine del decorso dell'infezione presentarono un apparente benessere, in contrasto con il quadro ematologico assai grave.

DISCUSSIONE.

Come è noto, il *Macacus rhesus* è estremamente suscettibile all'infezione da *Pt. knowlesi*; i parassiti si sviluppano con grande rapidità e nel corso di 6-8 giorni dall'inoculazione per via endovenosa si può trovare un numero enorme di parassiti nel sangue periferico. Tale infezione porta, quasi senza eccezione, alla morte, se non si interviene precocemente con un trattamento adeguato, trattamento che deve essere ripetuto anche nel corso delle numerose recidive, spesso molto gravi, sino a che l'animale non ha conseguito un sufficiente stato di premunizione.

Durante questo stato di premunizione, le reinfezioni con il ceppo omologo non sono possibili e tale fatto è stato spiegato da numerosi autori con la presenza nel sangue di sostanze protettive specifiche.

Dal complesso dei risultati conseguiti, si può confermare la formazione di anticorpi protettivi nel siero delle scimmie durante l'infezione malarica sperimentale.

Difatti, il siero proveniente da scimmie affette da infezione malarica cronica di varia durata, iniettato in scimmie normali sperimentalmente infettate con parassiti di ceppo omologo, dimostra una evidente azione protettiva sul decorso dell'infezione; mentre in alcuni animali la morte viene evitata e l'infezione acuta si modifica in una forma cronica, in altri animali, invece, il decorso dell'infezione acuta viene soltanto prolungato rispetto a quello normale. Questa azione protettiva del siero immune è più manifesta nelle infezioni provocate con un numero relativamente basso di parassiti.

Dai risultati ottenuti si può dedurre che le sostanze specifiche protettive nel siero di animali affetti da malaria cronica, devono essere presenti in una concentrazione molto bassa, dato che bisognò ricorrere a grandi quantità di siero immune, per poter dimostrare la loro presenza; nelle ricerche eseguite la quantità di siero immune somministrata è stata da 60 a 100 cc., con una media di 60 cc. per animale.

Per quanto riguarda il periodo più favorevole per la somministrazione del siero immune, per riuscire ad ottenere la massima protezione, le scimmie trattate già durante il periodo di incubazione non hanno di-

mostrato una maggiore resistenza contro l'infezione rispetto a quelle trattate dopo la comparsa dei primi parassiti nel sangue periferico.

Le dosi massive di siero immune in scimmie che presentavano una alta percentuale di globuli rossi parassitati, non offrono una evidente protezione contro l'infezione in atto. Nelle scimmie così trattate, è da segnalare, più che un'azione antiparassitaria, una evidente azione antitossica: nelle due scimmie, trattate con forti dosi di siero immune, non si osservò il noto quadro tossico proprio alle infezioni malariche gravi, ma sino quasi alla fine si notò un apparente benessere, in contrasto con il quadro ematologico molto grave.

E' importante notare ancora, che mentre il trattamento dell'infezione primitiva nei *Macacus rhesus* sperimentalmente infettati con il *P. knowlesi*, con una dose curativa di chinina o atebрина, non impedisce l'insorgenza di recidive gravi a breve distanza di tempo, che generalmente devono essere nuovamente curate, nelle 4 scimmie salvate con siero immune invece, non occorsero altri interventi medicamentosi, presentando l'infezione un decorso cronico, con presenza irregolare di un limitato numero di parassiti nel sangue periferico.

CONCLUSIONI.

Considerando i risultati di questa serie di indagini si può concludere:

1) Il siero immune, ottenuto da *Macacus rhesus* con infezione malarica cronica da *P. knowlesi*, dimostra una evidente azione protettiva sul decorso dell'infezione sperimentalmente provocata con parassiti di ceppo omologo: in alcune scimmie viene evitata la morte e l'infezione acuta si modifica in una forma cronica; in altre, invece, il decorso della infezione viene soltanto prolungato.

2) E' presumibile che le sostanze protettive specifiche del siero immune siano presenti in una concentrazione molto bassa, essendo necessarie forti quantità di siero immune per poter dimostrare la loro presenza.

3) Il siero immune, oltre che ad una azione antiparassitaria, dimostra un'azione antitossica, quando venga iniettato in forti dosi massive.

BIBLIOGRAFIA

(¹) **CELLI A.** - « La malaria », IV ediz., U.T.E., Torino (1910). - **CELLI A.**, cit. **Sabatini**.

(²) **SCHIMMERT A.** - « Eigenserum bei Malaria tropica », Wien. Klin. Wochenschr., 14 (1917).

(³) **SEYFARTH W.** - « Erfahrungen über tropische Malaria », Deutsch. Arch. Inn. Med., 134, 3-4 (1920).

(⁴) **SERIOLI G.** - Cit. **Sabatini** (1924).

(⁵) **KAUDERS O.** - « Immunitätsstudien bei Impfmalaria », Centralbl. Bakt., 104, 158-160 (1927).

(⁶) **TALIAFERRO W. H.** e **TALIAFERRO L. G.** - « Acquired immunity in avian malaria. - I. Immunity to superinfection. - II. The absence of protective antibodies in immunity superinfection. Journ. Prev. Med., 3, 197-223 (1929).

(⁷) **SABATINI G.** - « Ricerche di orientamento su proprietà immunitarie del sangue dei malarici ». Studi sassaresi, 8, 1-15 (1930).

(⁸) **RADOSAVLJEVIC A.** - « Versuche zum Nachweis von Antikörpern bei Malaria », Arch. Schiffs. Tropenhyg., 34, 629-643 (1930).

(⁹) **KORESSIOS N. T.** - « Essais de sérothérapie dans le paludisme », Riv. Malariolog., 12, 353-362 (1933).

(¹⁰) **NEUMANN H.** - « Der Nachweis des parasitiziden Antikörpers bei der Malaria des Menschen », Riv. Malariolog., 12, 319-334 (1933).

(¹¹) **FINDLAY G. M.** e **BROWN B. Z.** - « Relation of electric charge of red cells to phagocytosis in avian malaria », Brit. Journ. Exp. Path., 15, 148-153 (1934).

(¹²) **NAUCK E. G.** e **MALAMO B. Z.** - « Ueber Immunität bei Affenmalaria », Zentralbl. Immunitätsforsch., 84, 337-358 (1935).

(¹³) **SOTIRIADES D.** - « L'immunité passive dans le paludisme expérimental et naturel », Journ. Trop. Med. Hyg., 39, 257-264 (1936).

(¹⁴) **COGGESHALL L. T.** e **KUMM H. W.** - « Demonstration of passive immunity in experimental monkey malaria », Journ. Exp. Med., 66, 177-190 (1937).

