

**I vaccini meningococcici:  
stato attuale e prospettive future della loro standardizzazione  
biologica, chimico-fisica e immunologica**

FRANCA PODO e ALESSANDRA SIRACUSANO

*Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia, Istituto Superiore di Sanità*

INTRODUZIONE

Numerosi fattori hanno stimolato in questi ultimi anni un crescente interesse in campo sanitario verso la preparazione e l'impiego di vaccini efficaci nella prevenzione della meningite cerebrospinale (MCS). L'agente eziologico predominante di questa malattia è rappresentato da batteri della specie *Neisseria meningitidis*. Questi organismi presentano attività patogenetica solo nell'uomo, non essendo note manifestazioni spontanee sintomatiche né asintomatiche di tale malattia in altre specie animali.

In popolazioni « aperte » la MCS colpisce soprattutto l'infanzia. Sebbene l'uso di appropriate terapie antibatteriche abbia drasticamente ridotto la percentuale di casi ad esito letale, il rischio nei soggetti colpiti di danni neurologici permanenti rappresenta tuttora uno degli aspetti più inquietanti di questa malattia. D'altra parte in popolazioni « chiuse » (quali quelle costituite ad esempio dalle reclute nelle caserme) la malattia si presenta tuttora in molti Paesi, tra cui il nostro, in forma continuativa, sebbene sporadica.

In quest'ultimo decennio la MCS si è manifestata in forme epidemiche anche violente in America Latina, Africa, Europa, Asia e Medio Oriente, oltre a continuare a presentarsi in forme endemiche occasionali in numerosi Paesi, tra cui l'Italia, gli Stati Uniti etc. In particolare, meningococchi di sierogruppo A sono stati i principali responsabili di epidemie in Europa (Finlandia, 1975); i sierogruppi A e C hanno provocato forme epidemiche in America Latina (Brasile, 1974-75) mentre i sierogruppi B e C sono tuttora i maggiori responsabili di casi di meningite negli Stati Uniti. Il sierogruppo B provoca attualmente numerosi casi isolati di malattia anche in Europa. Sierogruppi minori sono associati sia a portatori sani, sia ad alcuni focolai epidemici.

Una indagine epidemiologica sui portatori sani di *N. meningitidis* recentemente compiuta in Italia, ha riscontrato nel 1977 la presenza di quasi tutti

i gruppi noti (A, B, C, Y, W 135, X e Z). All'interno di tali gruppi è stata evidenziata una bassa percentuale dei sierotipi 2, 8 e 9 e un'alta percentuale del sierotipo 12, oltre a ceppi non tipizzabili [1].

L'insorgere di ceppi di *N. meningitidis* resistenti ai sulfamidici da una parte, e dall'altra la scarsa efficacia della penicillina nel controllo dei portatori sani, hanno indotto le istituzioni sanitarie a riprendere in considerazione, oltre ai metodi di controllo chemioprofilattico e chemioterapeutico, quelli immunoprofilattici.

Nel 1969 Gotschlich, Goldschneider e Artenstein [2] hanno dimostrato definitivamente che polisaccaridi isolati dalla capsula di meningococchi dei sierogruppi A e C sono capaci di indurre risposta anticorpale specifica nell'uomo. I risultati di questi esperimenti insieme con la dimostrazione, derivata da studi epidemiologici [3-5] e da prove di laboratorio [2], del ruolo protettivo degli anticorpi sierici diretti specificamente contro i polisaccaridi della capsula, hanno costituito le basi immunologiche per la preparazione di vaccini polisaccaridici meningococcici.

Negli anni 1976-77 l'Organizzazione Mondiale della Sanità, sulla base delle conclusioni raggiunte nel 1975 da un Gruppo di Studio per il Controllo della Meningite Cerebrospinale [6], ha emanato una serie di linee-guida per la standardizzazione biologica e chimico-fisica di questi vaccini [7-9], esprimendo al tempo stesso la raccomandazione che gli Istituti ad orientamento sanitario promuovano ricerche e studi ulteriori per acquisire conoscenze più approfondite in questo campo.

La manifestazione ininterrotta, seppure occasionale, di casi di meningite cerebrospinale in Italia e la recente introduzione commerciale nel Paese di vaccini polisaccaridici specifici, hanno suggerito l'interesse di elaborare un quadro riassuntivo dello stato attuale e delle prospettive future per la standardizzazione dei controlli di qualità di questi vaccini.

La presente rassegna sarà soprattutto dedicata alla trattazione dei vaccini polisaccaridici, gli unici per i quali l'OMS abbia sinora definito precise linee-guida di standardizzazione biologica e chimico-fisica. Nella prima parte verranno riassunte le principali conoscenze attuali sulla composizione chimica dei polisaccaridi meningococcici e sulla relazione tra struttura molecolare e attività immunogenica nell'uomo. La seconda parte sarà dedicata alla descrizione dei controlli chimico-fisici e immunochimici, raccomandati alle autorità sanitarie nazionali dalle norme internazionali di standardizzazione dei vaccini polisaccaridici. Nella terza parte si darà un quadro schematico delle prospettive future per lo sviluppo dei metodi di controllo immunoprofilattico della MCS, sottolineando l'interesse di studi ulteriori, per approfondire la struttura molecolare e le proprietà immunogeniche degli antigeni polisaccaridici e proteici di *N. meningitidis*.

NEISSERIA MENINGITIDIS: SIEROGRUPPI E SIEROTIPI

Il genere *Neisseria* è costituito da diplococchi Gram-negativi, contenenti citocromo-ossidasi e una catalasi. I batteri della specie *N. meningitidis* sono organismi aerobici, che possono essere coltivati su terreno arricchito da sangue, siero, ascite o idrolizzato di caseina e amido (es. terreno di Müller-Hinton) a 37 °C. I ceppi di recente isolamento sono capsulati. Questi batteri sono classificati in base alle caratteristiche biochimiche dei componenti molecolari della capsula batterica. Sulla base di tecniche di tipizzazione sierologica (emoagglutinazione, immunodiffusione, immunoelettroforesi, controimmunoelettroforesi, ecc.), *N. meningitidis* è oggi suddivisa in 9 gruppi sierologici distinti: A, B, C, D, X, Y, Z, W 135 e 29-E. Composizione chimica e struttura molecolare dei polisaccaridi della capsula batterica sono i principali fattori responsabili delle proprietà antigeniche specifiche dei sierogruppi. Antigeni diversi da quelli polisaccaridici, presenti anch'essi sulla superficie esterna dei batteri, hanno permesso di suddividere i sierogruppi in 14 sierotipi distinti. Lo studio delle proprietà immunogeniche di questi ultimi antigeni riveste particolare rilevanza soprattutto nei casi in cui l'antigene polisaccaridico non è stato in grado sino ad oggi di stimolare risposta anticorpale specifica nell'uomo, come nel caso del sierogruppo B.

POLISACCARIDI MENINGOCOCCICI

1. - Estrazione e purificazione

Le colture di meningococco vanno facilmente incontro ad autolisi; prelevandole alla fine della fase di crescita logaritmica o all'inizio della fase stazionaria, i polisaccaridi gruppo-specifici possono essere isolati direttamente dal mezzo di coltura, dopo averne allontanato le cellule (v. Appendice). Numerosi studi sono stati condotti in questi ultimi anni per migliorare i metodi di estrazione e purificazione, soprattutto al fine di ottenere preparati di peso molecolare più elevato possibile. È stato infatti dimostrato [2-10] che l'attività immunogenica dei polisaccaridi meningococcici è strettamente dipendente dalla loro dimensione molecolare, come sarà illustrato nel seguito.

Un metodo molto efficace per isolare polisaccaridi di meningococco ad elevato peso molecolare è stato messo a punto da Gotschlich e Coll. nel 1969 [11]. Secondo questo procedimento i polisaccaridi vengono precipitati dal mezzo di coltura mediante l'uso di un detergente cationico, il bromuro di esadeciltrimetilammonio (denominazione commerciale «cetavlon»). L'associazione tra i polisaccaridi polianionici del meningococco e il detergente, carico positivamente al livello del gruppo di testa  $N^+ (CH_3)_3$ , dà luogo ad una reazione di precipitazione rapida e delicata, che evita al polisaccaride la de-

polimerizzazione conseguente ai procedimenti di estrazione usati in passato [12, 13]. Il polisaccaride viene successivamente dissociato dal detergente mediante estrazione con cloruro di calcio. Precipitazioni successive con etanolo rimuovono acidi nucleici e frammenti batterici dal preparato polisaccaridico, il quale viene infine separato dal detergente e dal cloruro di calcio mediante centrifugazione, precipitazione e lavaggi con solventi organici (etanolo, acetone, dietilere). Questo procedimento, usato da Gotschlich e Coll. [11] per i polisaccaridi dei sierogruppi A, B e C, è stato successivamente utilizzato, talora con alcune modifiche, per isolare anche i polisaccaridi di altri sierogruppi [14, 15]. Un metodo alternativo contempla l'uso di solfato di ammonio come agente precipitante [16, 17]. Per la rimozione delle proteine e dei lipopolisaccaridi (endotossine) possono essere usati due procedimenti alternativi: omogeneizzazione con cloroformio e butanolo (metodo Sevag [18]) o estrazione fenolica a freddo [19, 20]. Quest'ultimo procedimento è preferibile nella preparazione del polisaccaride di sierogruppo A, più sensibile di altri ai processi di depolimerizzazione [6, 21]. Un metodo di preparazione più rapido è stato suggerito da Bundle e Coll. [14, 15]; in esso i lunghi procedimenti di rimozione dei contaminanti vengono sostituiti da ultrafiltrazione su membrana del preparato polisaccaridico (dopo precipitazione con cetavlon, estrazione con fenolo e digestione con ribonucleasi).

I polisaccaridi isolati e purificati vengono infine essiccati sotto vuoto su anidride fosforica.

## 2. - *Composizione e struttura*

Dopo il completamento dei procedimenti estrattivi i preparati polisaccaridici vengono usualmente sottoposti a varie prove di laboratorio, per la determinazione microanalitica della composizione e purezza, per la caratterizzazione chimico-fisica della dimensione e struttura molecolare, nonché per il controllo immunochimico delle proprietà antigeniche e della presenza di polisaccaridi eterologhi.

Una descrizione dettagliata dei numerosi metodi di analisi utilizzati per la determinazione della purezza, composizione e struttura dei polisaccaridi meningococcici esula dagli scopi della presente rassegna. Verranno qui menzionate soltanto alcune delle principali tecniche chimiche e chimico-fisiche comunemente utilizzate, mentre in seguito saranno elencate le metodiche immunochimiche oggi impiegate per il controllo delle proprietà antigeniche.

L'analisi elementare e l'identificazione dei gruppi chimici costituenti si avvalgono di solito di tecniche quali:

- metodi termogravimetrici o di titolazione per la determinazione del contenuto di acqua residuo [22, 23];

- metodi spettroscopici per la determinazione del contenuto di acidi nucleici (spettroscopia u.v.);

- metodi colorimetrici per la determinazione del contenuto di proteine [24];

- tecniche microanalitiche dei prodotti di digestione, in particolare tecniche di assorbimento atomico e colorimetriche per la determinazione della composizione atomica del contenuto di ioni (esempi: contenuto di azoto [25], di fosforo [26], ecc.);

- microanalisi dei prodotti di idrolisi o di ossidazione selettiva (eventualmente sottoposti in precedenza a modificazioni chimiche quali acetilazione, de-acetilazione, metilazione, ecc.), mediante tecniche cromatografiche (strato sottile, carta, gas-liquido), analisi di aminoacidi [27] e tecniche colorimetriche (ad es. per la determinazione del contenuto in acido sialico [28, 29], glucosio e galattosio [30], gruppi acetilici [31-34], ecc.);

- risonanza magnetica nucleare del  $^{13}\text{C}$  [36-40].

La caratterizzazione chimico-fisica dei polisaccaridi meningococcici (peso molecolare medio, dimensione molecolare, configurazione anomeric e conformazione, struttura, stato di aggregazione, ecc.) è stata sinora compiuta soprattutto mediante:

- metodi di gel-filtrazione;

- ultracentrifugazione analitica;

- analisi chimica dei gruppi riducenti (ad es. metodo del boroidruro triaziato e del boroidruro di sodio [17, 35]);

- varie misure chimico-fisiche, tra cui pnenometria, viscosimetria, diffusione di luce laser, rotazione ottica, risonanza magnetica nucleare del  $^{13}\text{C}$ , spettroscopia IR.

Una relazione più dettagliata sulle conoscenze attuali dello stato di polimerizzazione e di aggregazione dei polisaccaridi meningococcici, in relazione alle loro proprietà immunogeniche, verrà qui tralasciata. Nella presente rassegna verranno soltanto riassunte le principali informazioni strutturali sinora acquisite sulla composizione chimica e dimensione molecolare dei polisaccaridi isolati da vari sierogruppi, in relazione soprattutto alla standardizzazione dei procedimenti analitici di controllo dei vaccini corrispondenti.

Nella Tab. 1 sono riportati alcuni dati fondamentali sulla composizione chimica dei polisaccaridi isolati da vari sierogruppi di *N. meningitidis*. Nella Fig. 1 sono illustrate le strutture delle unità ripetitive che costituiscono i polisaccaridi isolati dai sierogruppi principali.

TABELLA I

Composizione chimica dei polisaccaridi gruppo-specifici di *Neisseria meningitidis*

Sierogruppo	Unità ripetitive	Tipo di legame	Contenuto dei gruppi O-acetilici (a)	Localizzazione dei gruppi O-acetilici
A [17,38]	2 acetamido 2-deossi-3-O-acetil-mannopiranosil-fosfato (NAcMan-6P)	$\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)	70 % (b)	C-3 dei residui Man
B [35,39]	acido N-acetilneuraminico (o sialico) (NANA)	$\alpha$ (2 $\rightarrow$ 8)	—	—
C [35,39]	acido N-acetilneuraminico (o sialico) (NANA)	$\alpha$ (2 $\rightarrow$ 9)	130 % (c,d)	C-7 e C-8 dei residui NANA
X [14,38]	2-acetamido 2-deossi-D-glucopiranosil-fosfato	$\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)	—	—
Y (=Bo) [40]	acido 4-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-2-D-N-acetilneuraminico	$\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)	110 % (e)	non localizzati
W 135 [40]	acido 4-O- $\alpha$ -D-galattopiranosil- $\beta$ -D-N-acetilneuraminico	$\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)	—	—
29-E (-Z) [49]	2-acetamido-2-deossi-galattopiranosio $\pm$ acido 3-deossi-D-manno-octulosonico (47 e 53 % rispettivamente (f))	—	—	—
D	—	—	—	—
Z	—	—	—	—

composizione chimica non nota  
composizione chimica non nota

(a) Espresso in percentuale di unità O-acetilate.

(b) Determinato nel ceppo 604 A (Laboratory Center for Disease Control, Ottawa, Canada).

(c) Mediante procedimenti sierologici è stato possibile suddividere i meningococchi di sierogruppo C in due ceppi distinti, denominati C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> [5]. Nei ceppi (che costituiscono la maggioranza) le unità NANA sono O-acetilate, mentre negli altri i costituenti O-acetilici sono acenti.

(d) Determinato nel ceppo 224 C (Laboratory Center for Disease Control, Ottawa).

(e) Determinato nel ceppo 538 (Laboratory Center for Disease Control, Ottawa).

(f) Determinato nel ceppo 550 (Laboratory Center for Disease Control, Ottawa).

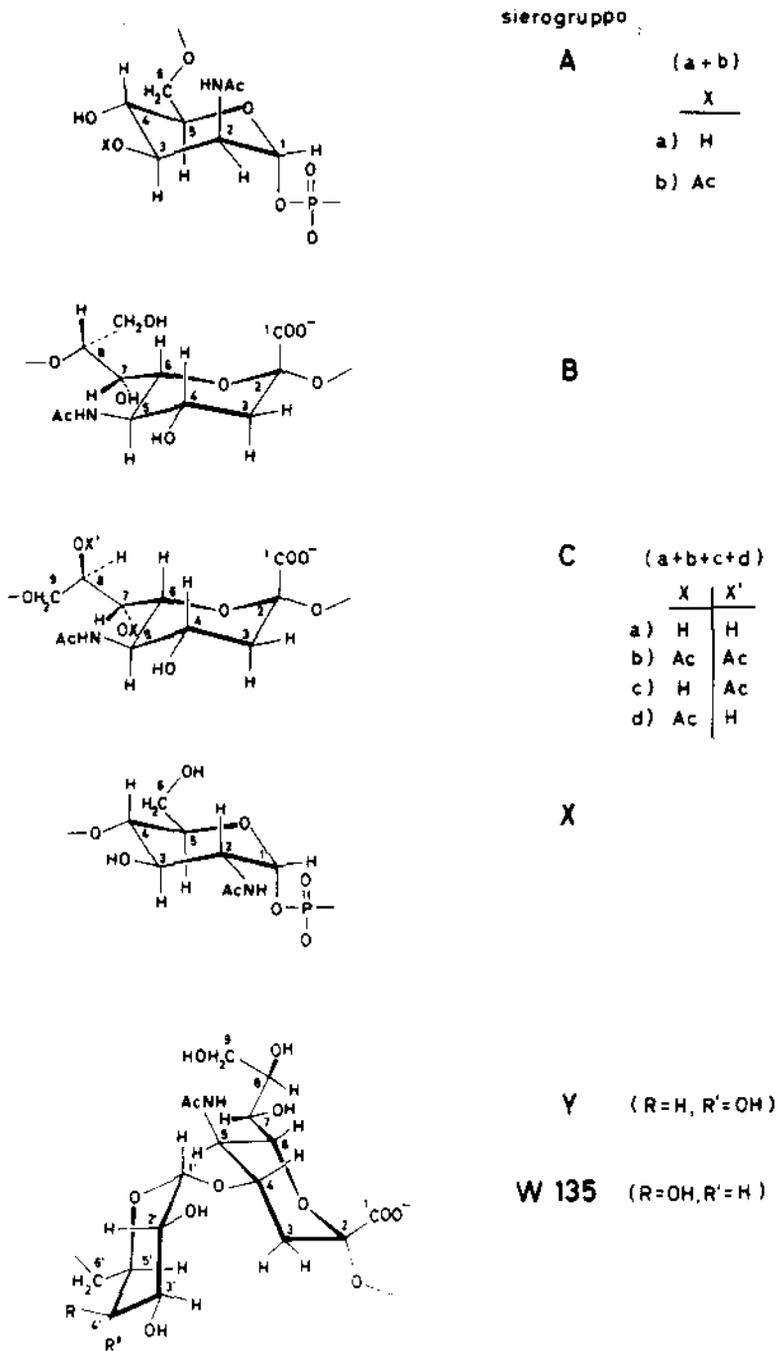


Fig. 1. — Struttura delle unità saccaridiche costitutive di alcuni polisaccaridi meningococchi.

### 3. - Polisaccaride del sierogruppo A.

#### Struttura chimica.

Scherp e Rake dimostrarono nel 1935 che l'antigene responsabile della specificità sierologica del gruppo A è rappresentato da un polisaccaride contenente sia fosforo che azoto [41]. Dieci anni più tardi questi risultati venivano confermati da Kabat e Coll. [13]. Informazioni più dettagliate sulla composizione chimica sono state ottenute di recente da Gotschlic e Coll. [11] e successivamente da Liu e Coll. [17], mediante l'impiego di varie tecniche microanalitiche e chimico-fisiche. Questi studi hanno indicato che il polisaccaride isolato dal sierogruppo A è costituito da unità di N-acetil-mannosamina fosfato (NAcMan-6P), parzialmente O-acetilate, associate essenzialmente mediante legami fosfodiesterici di tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Studi di risonanza magnetica nucleare del  $^{13}\text{C}$  hanno consentito di concludere che, allo stato nativo, questi polisaccaridi consistono esclusivamente di catene lineari di unità saccaridiche completamente N-acetilate, associate soltanto mediante i legami fosfodiesterici anzidetti (escludendo cioè l'esistenza di altri legami glicosidici, almeno entro i limiti di sensibilità della tecnica [38]). L'uso di questa tecnica permetteva inoltre di localizzare i gruppi O-acetilici esclusivamente nella posizione C-3 dell'anello esapiranosidico, nonché di valutare la percentuale di O-acetilazione (ca. 70 % nel ceppo 604 A, Laboratory Center for Disease Control, Ottawa). Studi conformazionali compiuti ancora mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN hanno indicato infine che il polisaccaride assume conformazioni estese rispetto alla rotazione intorno al legame O-C1 [37, 38, 42].

#### Dimensione molecolare.

Alcune informazioni dettagliate sulla dimensione, forma e stato di aggregazione del polisaccaride sono state ottenute mediante tecniche cromatografiche (gel-filtrazione su Sepharose 4B, ultracentrifugazione analitica, picnometria, viscosimetria e determinazione del numero di gruppi riducenti [11, 35, 43, 44]). La determinazione del peso molecolare medio e l'analisi del numero di gruppi riducenti hanno fornito informazioni sullo stato di aggregazione di due frazioni diverse [44] isolate per gel-filtrazione da una stessa preparazione di polisaccaride. La prima frazione (A-1), di peso molecolare medio  $\overline{PM} \approx 167.000$  Daltons, appariva costituita in media dall'aggregazione di circa 6 catene di 98 residui NAcMan-6P, mentre la seconda (A-2) di peso molecolare  $\overline{PM} \approx 25.000$ , era costituita dalla aggregazione di due catene lunghe in media 42 residui. La natura delle interazioni responsabili della formazione di tali aggregati non è nota, sebbene i dati di  $^{13}\text{C}$  RMN escludano, come detto, che si tratti di *cross-links* di tipo glicosidico [38].

Le differenze osservate nella lunghezza media delle catene che costituiscono le due frazioni A-1 e A-2 sono attribuite alla termolabilità del polisaccaride di sierogruppo A in soluzione [21]. A causa di tale termolabilità si assiste infatti ad una progressiva diminuzione del peso molecolare medio del polisaccaride, disciolto in mezzo acquoso e conservato a temperature superiori a 4 °C. Poiché, come sarà discusso nel seguito, l'immunogenicità del polisaccaride dipende strettamente dalla sua dimensione molecolare, la termolabilità di questi preparati diviene un punto fondamentale nella standardizzazione chimico-fisica dei controlli di qualità dei corrispondenti vaccini [45]. Il problema di aumentare la termostabilità di questi polisaccaridi è stato affrontato di recente in alcuni laboratori. In particolare è stato dimostrato che l'aggiunta di piccole quantità di lattosio alla soluzione acquosa del polisaccaride, prima della sua liofilizzazione, ne aumenta notevolmente la termostabilità a temperatura ambiente, una volta che esso venga riportato in soluzione [21, 46].

#### 4. - Polisaccaridi dei sierogruppi B e C

##### *Struttura chimica.*

Isolato per la prima volta da Watson e Scherp nel 1958 [12] e identificato da Watson, Marinetti e Scherp [47] come omopolimero dell'acido N-acetilneuraminico (NANA), il polisaccaride di sierogruppo C è stato ottenuto nel 1969 da Gotschlich e Coll. [11] in forma purificata e ad un alto peso molecolare. Analisi chimiche, compiute nel 1971 da Liu e Coll. [35] hanno meglio caratterizzato sia questo polisaccaride, sia quello isolato dal sierogruppo B, anche esso identificato come omopolimero dell'acido sialico. Questi studi hanno anche indicato alcune delle basi strutturali che regolano il diverso comportamento immunologico dei due polisaccaridi. Le maggiori differenze indicate dagli studi microanalitici tra i polisaccaridi di gruppo B e C sono le seguenti: 1) le unità NANA sono congiunte con legame  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 8) nel polisaccaride B e con legame  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 9) nel polisaccaride C; 2) il polisaccaride B presenta una maggiore resistenza alla metanolisi catalizzata da acidi, mentre il polisaccaride C è più resistente all'azione della neuraminidasi.

A causa dei problemi connessi con l'instabilità chimica dei residui NANA in ambiente acido, l'uso di tecniche non distruttive quali la  $^{13}\text{C}$ -RMN è apparso particolarmente utile per caratterizzare la struttura dei polisaccaridi B e C allo stato nativo [37, 39]. In particolare, nel caso dei polisaccaridi del sierogruppo C, dati spettrali di  $^{13}\text{C}$ -RMN hanno consentito di ottenere informazioni dettagliate sul grado di O-acetilazione e sulla localizzazione di tali sostituenti sui residui NANA. Nei polisaccaridi di sierogruppo C isolati dal ceppo 2241 (Laboratory Center for Disease Control, Ottawa) è stata valutata

la presenza di 1,16 sostituenti O-acetilici per ogni residuo NANA; 24 % dei residui stessi apparivano completamente non acetilati in due posizioni (C-7 e C-8) oppure in una soltanto (preferenzialmente in C-7).

#### *Dimensione molecolare.*

Analogamente al polisaccaride di sierogruppo A, i polisaccaridi dei sierogruppi B e C sono stati studiati con varie tecniche chimico-fisiche per determinarne peso molecolare medio, forma e stato di aggregazione. In particolare, la determinazione quantitativa del numero di gruppi riducenti ha consentito di ottenere alcune informazioni sullo stato di aggregazione medio di varie frazioni separate da preparati polisaccaridici di gruppi B e C, mediante cromatografia su colonna di Sepharose 4B [44]. Nel caso dei polisaccaridi di sierogruppo C, sono state isolate due frazioni consistenti rispettivamente di 7 e di 3 catene di residui NANA, tutte di peso molecolare medio  $\bar{P}M \approx 45.000$  Daltons (circa 150 residui). La differenza tra le due frazioni polisaccaridiche (di peso molecolare medio rispettivo 325.000 e 140.000 Daltons) era pertanto attribuita ad un diverso stato di aggregazione, piuttosto che a differenze nella lunghezza media delle catene. La frazione di polisaccaride B esaminata ( $\bar{P}M \approx 26.000$  Daltons) consisteva invece essenzialmente di catene singole, di lunghezza media di 76 residui NANA [35, 44]. In conclusione, la lunghezza media delle catene della frazione polisaccaridica isolata dal sierogruppo B risultava circa la metà di quella delle catene delle frazioni polisaccaridiche isolate dal sierogruppo C. Le ragioni strutturali di questo comportamento, nonché delle difficoltà di ottenere frazioni di polisaccaride B caratterizzate da catene più lunghe [35, 44], non sono note. Liu e Coll. [44] ipotizzano che esse vadano ricercate nei particolari stati conformazionali (peraltro non noti) che il polisaccaride può assumere in soluzione. Gli stessi AA. hanno anche proposto che l'incapacità del polisaccaride B di formare aggregati stabili (del tipo di quelli del polisaccaride C) potrebbe essere uno dei fattori rilevanti nel determinare la scarsa immunogenicità del polisaccaride B nell'uomo. Questi problemi indicano la necessità di approfondire ulteriormente gli aspetti strutturali e conformazionali di questi polisaccaridi in soluzione. Una attenta analisi dei parametri chimico-fisici (coefficiente di sedimentazione, viscosità intrinseca, fattore di forma, ecc.), valutati per le frazioni polisaccaridiche anzidette (B e C [44]), sembra indicare che le evidenze sperimentali non siano in realtà ancora sufficienti a giustificare l'ipotesi che le catene di polisaccaride B assumano strutture steriche drasticamente diverse da quelle del polisaccaride C.

#### 5. - *Polisaccaridi di altri sierogruppi*

La composizione chimica del polisaccaride di sierogruppo X è stata identificata da Bundle e Coll. [14] in un polimero composto di unità ripetitive di

2-acetamido-2-deossiglucopiranosil-fosfato. I risultati di metodi microanalitici, uniti a quelli di studi chimico-fisici (rotazione ottica, IR, RMN) hanno indicato che il polimero non è O-acetilato e che i residui costituenti assumono la configurazione  $\alpha$ . Il problema della localizzazione del legame tra i residui è stato definitivamente risolto dall'analisi degli spettri  $^{13}\text{C}$ -RMN [38] che hanno indicato che esso è di tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). I profili di eluizione, ottenuti dalla filtrazione su gel di Sephadex G-200, hanno indicato la presenza di una sola frazione omogenea ad alto peso molecolare ( $\overline{PM}$  superiore a 100.000 Daltons). Tuttavia l'alto valore di peso molecolare, determinato con tale metodo, non corrisponde alla stima della lunghezza media delle catene, determinata mediante analisi dei gruppi riducenti ( $PM \approx 15.000$  Daltons, corrispondenti a circa 50 unità). Questi dati indicano che anche il polisaccaride X tende a formare aggregati [15].

Studi di  $^{13}\text{C}$ -RMN, condotti parallelamente ad analisi chimiche dei prodotti di idrolisi hanno indicato che il polisaccaride di meningococco di sierogruppo Y (ceppo 548, Laboratory Center for Disease Control, Ottawa) è costituito da porzioni equimolari di D-glucosio e di acido sialico; tutti i legami sono nella configurazione  $\alpha$  e congiungono il carbonio C-6 del D-glucosio con il C-4 dell'acido sialico [40]. I due residui si alternano regolarmente lungo la catena polisaccaridica, che risulta inoltre parzialmente O-acetilata. Sulla base dell'analisi strutturale il polisaccaride Y (ceppo 548) è risultato identico al polisaccaride Bo (ceppo 2841) in accordo con i dati sierologici [48].

Il polisaccaride di sierogruppo W 135 differisce da quello del sierogruppo Y per l'assenza di O-acetilazione e per la diversa configurazione di un singolo gruppo ossidrilico sull'unità disaccaridica ripetitiva [40] (unità di D-galattosio sostituite a quelle di D-glucosio).

L'antigene polisaccaridico della capsula di *N. meningitidis* di sierogruppo 29-E è costituito da porzioni equimolari di acido 3-deossi-D-manno-octulosonico (KDO) e di 2-acetamido-2-deossi-galattosio [49]. La presenza di KDO è stata riconosciuta in passato tra i componenti lipopolisaccaridici della parete cellulare di *E. coli* e vari altri batteri Gram-negativi (inclusa *N. meningitidis* [50]), dove esso tipicamente svolge il ruolo di congiungere la parte polisaccaridica a quella lipidica. *N. meningitidis* di sierogruppo 29-E è stato il primo organismo batterico in cui sia stato dimostrato che il KDO può essere associato unicamente ad un componente saccaridico. Studi microanalitici e chimico-fisici hanno indicato che il KDO nel polisaccaride 29-E assume configurazione D ed è legato in C-7 oppure in C-8. Spettri di  $^{13}\text{C}$ -RMN hanno dimostrato, infine, che il polisaccaride è O-acetilato [38].

## IMMUNOGENICITÀ DEI POLISACCARIDI MENINGOCOCCICI

Le basi immunologiche per la preparazione dei vaccini anti-MCS derivano essenzialmente da dati epidemiologici, comprovanti che gli individui colpiti da questa malattia sono privi di anticorpi umorali rivolti verso i meningococchi; la MCS, infatti, si manifesta più per particolare sensibilità dell'individuo ospite, che per innata virulenza dell'agente infettante; il contatto con ceppi di *N. meningitidis* non comporta necessariamente l'insorgenza della malattia, ma può anche causare soltanto la presenza del microorganismo nel nasofaringe per settimane o mesi. È stato inoltre osservato che la malattia si manifesta prevalentemente nell'infanzia e nelle popolazioni « chiuse », con conseguente immunità permanente protettiva, e che le epidemie hanno luogo periodicamente (ad esempio negli USA con circa 10 anni di intervallo), a conferma della necessità, per lo sviluppo della malattia, di una popolazione immunologicamente vergine. La dimostrazione della presenza di anticorpi anti-meningococco [3] nel siero umano e le osservazioni precedenti dimostrano che nell'uomo la risposta immunologica è mediata da anticorpi umorali; esiste inoltre una correlazione tra età e malattia, dipendente dalla presenza di anticorpi naturali [4]. Si osserva infatti che nei neonati, che ricevono gli anticorpi materni attraverso la placenta, la malattia non è presente, mentre ne sono colpiti i bambini dai sei mesi ai due anni, privi di anticorpi naturali. Dai due anni in poi aumenta la resistenza ai meningococchi, in quanto si acquista una immunità naturale dovuta alla presenza asintomatica del microorganismo nel nasofaringe [4].

Già prima dei lavori di Gotschlich del 1969 si era cercato di provare la immunogenicità dei polisaccaridi isolati da ceppi di *N. meningitidis* in volontari umani [13, 52]. Tali prove ebbero scarso successo, in quanto i polisaccaridi usati avevano un basso peso molecolare (circa 50.000 Daltons). In seguito Kabat [53] dimostrò che i destrani sono buoni immunogeni nell'uomo solo se hanno un peso molecolare superiore a circa 100.000 Daltons. Quando Gotschlich e Coll. [11] isolarono, dopo precipitazione con cetavlon, dei polisaccaridi di peso molecolare superiore a 100.000 Daltons, si aprirono nuove prospettive nella preparazione dei vaccini anti-MCS. Furono effettuate prove di campo su volontari umani, che confermarono il ruolo di questi polisaccaridi ad alto peso molecolare come possibili immunogeni [2]. Tale materiale si dimostrò innocuo nell'uomo. I vaccini isolati dai sierogruppi A e C vennero successivamente preparati su larga scala e provati, oltre che nelle reclute militari, anche nelle popolazioni nelle epidemie del Brasile e della Finlandia.

Va inoltre considerato che, allo scopo di ottenere vaccini il più possibile efficienti ed a basso costo, vengono preparati vaccini combinati, così che in una singola iniezione possano essere somministrati due antigeni. Ad esempio il vaccino combinato di polisaccaridi meningococcici dei sierogruppi A e C

offre notevoli vantaggi quando ambedue i sierogruppi sono causa della malattia in una stessa popolazione, come è avvenuto durante l'epidemia del Brasile del 1974-75 [54].

Il polisaccaride del sierogruppo B, invece, si è dimostrato non immunogenico nell'uomo; si è quindi ricercato il ruolo della proteina STA (*serotype antigens*) presente in esso come possibile immunogeno [55]. Questo meningococco è stato suddiviso in dodici distinti sierotipi che ne hanno permesso lo studio epidemiologico; il sierotipo 2 è associato al 50 % di casi di MCS dovuti al sierogruppo B [56]. (\*)

Circa l'80 % di persone adulte che hanno ricevuto una singola dose di 50 µg di vaccino A e C, presentano anticorpi omologhi dosabili, appartenenti alle classi IgG, IgM ed IgA. La misura degli anticorpi è effettuata attualmente mediante quattro test principali:

1) *Test battericida* [3]. È un metodo abbastanza sensibile e non richiede l'uso di antigeni purificati. Per questa prova risultano particolarmente critici sia i terreni usati per la crescita dei meningococchi, sia l'origine del complemento; risulta quindi difficile confrontare i dati provenienti da laboratori diversi.

2) *Emoagglutinazione indiretta* [11]. Tale metodica è di facile applicazione ed altamente specifica, sebbene i risultati siano semiquantitativi e con la limitazione che si dosano preferenzialmente le IgM.

3) *Precipitazione quantitativa* [10]. Questa tecnica dosa gli anticorpi indipendentemente dalla classe di appartenenza. Il metodo (che è anche usato per la determinazione di anticorpi antipneumococco) è in realtà laborioso e poco sensibile, ma tuttavia utile, poiché, data la sua precisione, si presta ad un confronto quantitativo della risposta anticorpale ai due polisaccaridi.

4) *Saggio radioimmunologico* [57]. Tale tecnica, che è senz'altro la più sensibile, presenta gli unici svantaggi dell'uso di sostanze radioattive e dell'alto costo dell'equipaggiamento.

Si trovano buone risposte anticorpali tra le due e le quattro settimane successive alla vaccinazione, e generalmente esse si mantengono su buoni livelli per un lungo periodo prima di declinare: infatti per il polisaccaride di gruppo C si ha persistenza per almeno quattro anni, e per il gruppo A per quattordici mesi [58].

---

(\*) Il sierotipo 2 è associato, oltre che al sierogruppo B, anche ad altri sierogruppi quali C, Y e W 135 (v. rif. 55 e riferimenti in esso citati). In particolare, questo antigene è responsabile per l'80 % dei casi di meningite dovuti al gruppo C. Anche gli anticorpi diretti contro gli antigeni non-capsulari esercitano effetti protettivi contro la MCS.

STANDARDIZZAZIONE DEI VACCINI MENINGOCOCCICI:  
CONTROLLI CHIMICO-FISICI, IMMUNOCHEMICI E BIOLOGICI

I vaccini preparati con i polisaccaridi di meningococco appartengono ad una nuova classe di vaccini, per la quale sono stati descritti requisiti chimico-fisici ben precisi. Infatti questi prodotti, costituiti da polisaccaridi altamente purificati e chimicamente definiti, vengono caratterizzati in base alla loro composizione chimica e alla dimensione molecolare. Il problema fondamentale è costituito dal fatto che *N. meningitidis* non è patogena per specie animali diverse dall'uomo e che la risposta anticorpale a questi vaccini osservata nell'uomo è diversa dalla risposta che si può ottenere in animali da laboratorio. Il controllo *in vivo* dell'immunogenicità di questi preparati si potrebbe pertanto eseguire soltanto sull'uomo. In assenza di modelli animali accettabili sono quindi necessari dei controlli di laboratorio diversi da quelli che si usano normalmente per altri vaccini.

Attualmente disponiamo sia delle norme date dall'OMS, che di una linea guida data dal Bureau of Biologics, Food and Drug Administration (USA), per i vaccini dei sierogruppi A, C ed A/C (combinati).

*Controlli chimico-fisici*

Tutte le analisi debbono basarsi sul peso secco del polisaccaride sotto forma salina.

*Umidità residua.*

I polisaccaridi meningococcici di gruppo A e C purificati e liofilizzati sono altamente igroscopici e il livello di umidità del prodotto è determinante ai fini della sua stabilità [9]. È noto, ad esempio, che prodotti con un contenuto di idratazione del 4 % sono meno stabili di quelli con contenuto dell'1 %.

Per la determinazione finale del contenuto in acqua della polvere, l'OMS consiglia tre metodi alternativi, da scegliere in base alle disponibilità strumentali dei laboratori preposti all'analisi, ed alle disposizioni emanate in proposito dalle autorità di controllo nazionali.

1) L'analisi termogravimetrica costituisce il metodo di elezione, essendo la più efficace e sensibile. Questa analisi deve essere effettuata per i due polisaccaridi di gruppo A e C alla temperatura di 50 °C. È da notare, tuttavia, che per quanto riguarda il gruppo C, data la maggiore stabilità di questo polisaccaride, alcuni AA. [45] suggeriscono di effettuare le misure ad una temperatura di lavoro di 100 °C, allo scopo di raggiungere più rapidamente il peso costante.

2) Metodo di titolazione secondo Karl Fischer [23].

3) Metodo di perdita di peso dopo essiccamento su  $P_2O_5$ , sotto vuoto, a 37 °C. Il contenuto finale di umidità, così determinato, non deve superare il 2,5 % secondo le raccomandazioni OMS; tuttavia viene riportato da Wong e Coll. [45] che i prodotti di più alta qualità presentano spesso un grado di umidità inferiore all'1 %.

*Determinazione della composizione chimica.*

*Contenuto di gruppi O-acetilici.* — Il prodotto finale deve avere un contenuto di O-acetile uguale o maggiore di 2 mmol/g di polisaccaride di gruppo A e di 1,5 mmol/g per il polisaccaride di gruppo C. Questo contenuto deve essere determinato con il metodo di Hestrin [34] (usando come standard cloruro di acetilcolina), senza l'aggiunta di sali o di altri additivi al campione utilizzato per il dosaggio. Per quanto riguarda il gruppo C la Food and Drug Administration impone nella sua linea-guida un contenuto minimo di O-acetile pari a 2 mmol/g.

L'importanza dei gruppi O-acetilici in relazione alla immunogenicità di questi vaccini non è stata ancora provata; questo dato è tuttavia indicativo di eventuali trattamenti chimici superflui durante i processi di isolamento e purificazione.

*Contenuto di fosforo inorganico nel vaccino di sierogruppo A.* — Il contenuto di fosforo non deve risultare inferiore all'8 % di peso secco. Esso viene determinato mediante il micrometodo di Chen [26].

A questo metodo classico, raccomandato dalle due Organizzazioni, si affianca anche la determinazione del contenuto di mannosammina fosfato, mediante il dosaggio con analizzatore di aminoacidi, dopo idrolisi acida [45]. Tale contenuto non deve essere inferiore al 60 % di peso secco.

*Contenuto di acido sialico nel vaccino di sierogruppo C.* — Il contenuto di acido sialico (calcolato come acido N-acetilneuraminico libero, PM = 309) non deve essere inferiore all'80 ± 2 % del peso secco. Per questo dosaggio si segue il metodo di Svennerholm [28], usando come riferimento acido sialico di purezza maggiore al 99 %.

*Contenuto di proteine.* — Il contenuto di proteine, determinato secondo il metodo di Lowry [24], usando come riferimento BSA cristallina, deve risultare inferiore all'1 % per i due gruppi di vaccini.

*Contenuto di acidi nucleici.* — Questo dosaggio va effettuato mediante assorbimento all'u.v. a 260 nm, su materiale privo di sali o di altri prodotti chimici aggiuntivi. Il contenuto di acidi nucleici deve risultare inferiore all'1 % (in peso).

*Dimensione molecolare.* — Gli antigeni di sierogruppo A e C sono eterogenei nella distribuzione del peso molecolare determinato mediante analisi di sedimentazione in ultracentrifuga analitica [45]. La loro dimensione molecolare media viene determinata mediante tecniche di gel-filtrazione su colonna di Sepharose 4B. La cromatografia deve essere effettuata in un solvente di forza ionica 0,2 mol/Kg. Il peso molecolare viene determinato misurando la distribuzione del coefficiente di ripartizione ( $K_D$ ) del polisaccaride nel picco maggiore della curva di eluzione. Almeno il 65 % del polisaccaride di sierogruppo A e almeno il 75 % del polisaccaride di sierogruppo C debbono essere raccolti prima di raggiungere il valore di  $K_D = 0,50$ .

### *Controlli immunochimici*

*Tests per la specificità sierologica ed identità.* — Questi controlli, eseguiti mediante la tecnica di inibizione dell'emoagglutinazione passiva, permettono sia di identificare il prodotto, che di riconoscere la presenza di antigeni polisaccaridici eterologhi presenti nei vaccini. Per il test di specificità sierologica l'inibizione dell'emoagglutinazione deve essere effettuata separatamente per ogni polisaccaride e l'antigene dovrà inibire specificamente l'agglutinazione di eritrociti sensibilizzati con il corrispondente antigene meningococcico, da parte di anticorpi specifici contro lo stesso sierogruppo. Per quanto riguarda il test di identità non deve esserci inibizione alla concentrazione minima di 100  $\mu\text{g/ml}$ , da parte del vaccino in esame (A o C) dell'emoagglutinazione del polisaccaride eterologo (C o A). Oltre a questo metodo, nel lavoro di Wong e Coll. [45] è riportato allo stesso scopo il test della controimmuno-elettroforesi, che si rivela utile solo come test di conferma, in quanto la presenza di piccole impurezze, dovute a contaminanti di basso peso molecolare, rivelate dalla emoagglutinazione indiretta, potrebbero non essere evidenziate con tale metodo.

### *Controlli biologici di sicurezza*

Tali controlli (sterilità, tossicità anormale, verifica dell'assenza di pirogeni) sono gli stessi di quelli richiesti per gli altri vaccini. Essi possono essere effettuati utilizzando le tecniche standard e usando le dosi sotto specificate.

Per quanto riguarda la sterilità occorre ricordare che i metodi di preparazione e purificazione di questi polisaccaridi non consentono e non prevedono la lavorazione in condizioni asettiche. Il prodotto finale, disciolto in condizioni di lavoro asettiche in una soluzione adatta, prima della liofilizzazione viene sterilizzato mediante filtrazione su membrana (dimensione dei pori 0,22  $\mu\text{m}$ ) [7-9].

*Test di tossicità anormale.*

a) Tossicità in cavie: almeno 5 cavie del peso di circa 350 g debbono essere inoculate intraperitoneo con 500 µg di polisaccaridi.

b) Tossicità nel topo: almeno 5 topi del peso di circa 18 g debbono essere inoculati intraperitoneo con 100 µg di polisaccaridi.

*Verifica dell'assenza di pirogeni.*

Il vaccino ricostituito deve essere diluito in soluzione fisiologica apirogena in modo che ogni coniglio riceva le seguenti dosi di polisaccaride per Kg di peso corporeo:

- vaccino di sierogruppo A: 0,025 µg;
- vaccino di sierogruppo C: 0,025 µg;
- vaccino polivalente di sierogruppi A e C: 0,050 µg.

*Conservazione dei vaccini*

Data la termolabilità del polisaccaride di sierogruppo A, l'OMS raccomandava in passato di conservare i corrispondenti vaccini a -20 °C, temperatura alla quale la velocità di depolimerizzazione risultava trascurabile. Poiché l'aggiunta di agenti stabilizzanti quali il lattosio (a concentrazioni comprese tra 2,5 e 5 mg per dose umana di polisaccaride) rallenta drasticamente la velocità di depolimerizzazione di questo vaccino dopo ricostituzione, l'OMS ha recentemente modificato la normativa vigente relativa alla temperatura di conservazione, unificando per i due vaccini la temperatura richiesta nell'intervallo tra 2 e 8 °C.

*Verifica della concentrazione di polisaccaride nel prodotto finale*

È necessario verificare che il vaccino di sierogruppo A contenga almeno 75 mg di fosforo per g di polisaccaride e che il sierogruppo C contenga 750 mg di acido ialico per g di polisaccaride. Per il sierogruppo A, data la presenza di lattosio, è necessario dializzare il prodotto ricostituito contro 50 volumi di H<sub>2</sub>O per 12-18 ore, ad una temperatura compresa tra 2 e 8 °C, prima del dosaggio.

PROSPETTIVE FUTURE PER LA CARATTERIZZAZIONE E LA  
STANDARDIZZAZIONE DEI VACCINI MENINGOCOCCICI

Come si è detto nelle precedenti sezioni, la risposta anticorpale a *N. meningitidis* è diretta soprattutto contro componenti della superficie cellulare, quali i polisaccaridi della capsula (gruppo-specifici) e strutture antigeniche

meno definite (tipo-specifiche e *cross-reagenti*). L'Organizzazione Mondiale della Sanità incoraggia ricerche ulteriori nei campi microbiologico, chimico-fisico ed immunologico, rivolte a conseguire conoscenze più approfondite sugli antigeni di superficie, al fine di migliorare la preparazione di vaccini anti-MCS. Infatti alcune evidenze sperimentali hanno anzitutto dimostrato che altri componenti molecolari, oltre ai polisaccaridi, possono indurre anticorpi protettivi. Appare pertanto interessante individuare e isolare questi componenti, in vista della possibilità di indurre con essi una protezione anti-MCS estesa a più sierogruppi. Inoltre, la presenza di anticorpi sierici specifici contro l'antigene di sierotipo 2 in bambini di età inferiore ai due anni, che hanno contratto malattie meningococciche dovute ai sierogruppi B e C di sierotipo 2, indica la potenziale immunogenicità dell'antigene proteico nella prima infanzia [55] e pone interessanti prospettive per la preparazione eventuale di vaccini corrispondenti. Questi ultimi vaccini non sono stati, però, ancora standardizzati a sufficienza da permettere conclusioni finali relative a completi e corretti controlli di qualità. È utile altresì ricordare che alcuni polisaccaridi meningococcici risultano oggi scarsamente immunogenici nell'uomo (esempio rilevante quello già menzionato del polisaccaride di sierogruppo B), mentre l'efficacia immunoprolattica di polisaccaridi isolati da sierogruppi minori è ancora in fase di studio. Anche i polisaccaridi isolati dai sierogruppi A e C, nonostante il loro vasto e utile impiego come vaccini, presentano certamente alcune carenze rispetto ad un completo controllo immunoprolattico della MCS. Infatti i polisaccaridi di sierogruppo C non risultano efficaci in bambini di pochi mesi di età; inoltre l'immunità indotta nell'uomo dai polisaccaridi di sierogruppo A e C è strettamente limitata al sierogruppo da cui gli stessi polisaccaridi sono stati isolati. Al fine di aumentare l'efficacia immunogenica dei polisaccaridi meningococcici nell'uomo, viene oggi suggerita l'opportunità di somministrare il polisaccaride coniugato a proteine *carrier*, oppure insieme ad opportuni adiuvanti.

La messa a punto di nuove tecniche immunochimiche potrebbe, inoltre, risultare particolarmente utile ai fini di un più efficace controllo di questi vaccini. La tecnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) adattata per la determinazione di antigeni polisaccaridici si è rivelata sensibile e specifica anche applicata, con alcune varianti, al dosaggio degli anticorpi [59]. Il metodo ELISA potrà essere usato in alternativa al metodo RIA (*radioimmunoassay*), con il notevole vantaggio, rispetto a quest'ultimo, di evitare l'uso di sostanze radioattive.

Il grave problema costituito dalla mancanza di modelli animali accettabili su cui sia possibile provare l'efficacia di questi vaccini polisaccaridici potrà alternativamente essere risolto con l'impiego di queste tecniche più sensibili, che hanno già dato risultati incoraggianti nei topi [60]. Alcuni progressi nella sperimentazione animale sono stati effettuati di recente su babuini [61].

D'altra parte, come anche rilevato esplicitamente dal Gruppo di Esperti per il controllo della meningite cerebrospinale dell'OMS [6], una migliore conoscenza della struttura e conformazione dei vari polisaccaridi meningococcici risulterà essenziale ai fini di razionalizzare i meccanismi molecolari che regolano l'attività immunogenica di tali sistemi. In questo contesto è necessario compiere ulteriori ricerche sperimentali per meglio comprendere il ruolo di parametri chimico-fisici quali peso molecolare medio, struttura e forma degli aggregati presenti nelle frazioni polisaccaridiche isolate mediante gel-filtrazione. Infatti, sebbene la composizione chimica di molti polisaccaridi meningococcici sia stata completamente chiarita in questi ultimi anni, ancora scarse sono le informazioni sulla struttura sterica (secondaria, terziaria, quaternaria) di questi sistemi molecolari, nonché sulla possibilità degli aggregati di passare da stati più ordinati a stati meno ordinati, mediante « transizioni », possibilmente regolate da parametri quali forza ionica, temperatura ecc. Tra gli studi chimico-fisici recentemente sviluppati in questa direzione, quelli che si avvalgono delle tecniche RMN [36-40] e di diffusione della luce laser [62-64] appaiono particolarmente interessanti. La potenzialità dell'uso della  $^{13}\text{C}$ -RMN per identificare in modo rapido e non distruttivo la natura e lo stato di legame degli anelli saccaridici, la loro configurazione anomeric e la localizzazione dei gruppi chimici sostituenti si è dimostrata particolarmente importante. Si prevede che lo studio della risonanza magnetica di altri nuclei (quali protone e fosforo) possa essere utile per meglio chiarire i fenomeni associativi ed evidenziare eventuali meccanismi molecolari di transizione da stati meno ordinati a stati più ordinati. Nel caso della tecnica di diffusione della luce laser, usata di recente per lo studio di polisaccaridi di sierogruppo C [62-64], i vantaggi più rilevanti del metodo vengono ravvisati nella sua natura non distruttiva, oltre che nella elevata sensibilità. In particolare, un lavoro apparso di recente su questo argomento [64] ha dimostrato che una corretta standardizzazione delle condizioni sperimentali (forza ionica, pH, controllo dell'equilibrio di dissoluzione) può condurre ad un'accurata determinazione del coefficiente di diffusione traslazionale medio, del raggio di girazione e del raggio di Stokes degli aggregati, in funzione della forza ionica.

Desideriamo ringraziare il Prof. G. Vicari per il continuo incoraggiamento e i numerosi consigli durante l'elaborazione di questa rassegna; la Prof. C. Collotti e il Dr. G. M. Bisso per la lettura critica del manoscritto.

*Ricevuto il 27 ottobre 1978.*

*Accettato il 18 novembre 1978.*

### Purificazione di polisaccaridi meningococcici (\*)

<i>Isolamento di polisaccaridi "grezzi"</i>	
<i>COLTURA OMOGENEA (40 l), cresciuta 12-16 ore, centrifugata 90 min, 2500 x g in 80 bottiglie da 0,5 l)</i>	
SEDIMENTO (cellule) (scartato) . . . . .	<p><b>SOPRANATANTE (40 l)</b></p> <p>incubare per una notte con 0,1 % di cetavlon a 0-4 °C; centrifugare 15 min, 2500 x g in 30 bottiglie da 0,5 l (3x)</p>
SOPRANATANTE (scartato) . . . . .	<p><b>PRECIPITATO (complesso polisaccaride-cetavlon)</b></p> <p>dissociare con ca. 200 ml CaCl<sub>2</sub> 1M aggiungere ca. 70 ml di etanolo alla concentrazione finale 25 % v/v; centrifugare 15 min 50.000 x g.</p>
PRECIPITATO (DNA, RNA, proteine) (scartato) . . . . .	<p><b>SOPRANATANTE</b></p> <p>aggiungere 730 ml di etanolo alla concentrazione finale 80 % v/v; centrifugare 5 min 1000 x g</p>
SOPRANATANTE (scartato) . . . . .	<p><b>PRECIPITATO</b></p> <p>lavare con 100 ml di etanolo assoluto; centrifugare 5 min 1000 x g;</p> <p>lavare con 100 ml di acetone; centrifugare 5 min 1000 x g;</p> <p>lavare con 100 ml di etere; centrifugare 5 min 1000 x g;</p>
SOPRANATANTI (scartati) . . . . .	<p><b>PRECIPITATO</b></p> <p>asciugare sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.</p> <p><b>POLISACCARIDE « GREZZO »</b></p>

(\*) Traduzione dall'inglese del documento WHO 1975-10-17. Rijks Instituut Voor de Volksgezondheid.

Segue: APPENDICE

**Purificazione di polisaccaridi meningococcici**

*Purificazione finale*

**POLISACCARIDE «GREZZO»:** sciogliere 2 g in 100 ml di Na-acetato (0,1 sat.) pH 7,2; estrarre con 100 ml di fenolo-acetato (100 g fenolo in 40 ml Na-acetato (0,1 sat.) pH 7,2; centrifugare 20 min a 10.000 x g (3x)

STRATI DI FENOLO: estrarre con acqua, centrifugare 20 min 1000 x g.

STRATI DI ACQUA

} combinati

STRATI DI FENOLO . . . . .

STRATI DI ACQUA

dializzare 24 ore contro CaCl<sub>2</sub> 0,1M; centrifugare 5 ore 100.000 x g.

PRECIPITATO (endotossina lipopolisaccaridica) (scartato) . . . . .

SOPRANATANTE

aggiungere etanolo fino a 80 % v/v; centrifugare 5 min 1000 x g

SOPRANATANTE (scartato) . . . . .

PRECIPITATO

lavare con 100 ml di etanolo assoluto; centrifugare 5 min 1000 x g;  
lavare con 100 ml di acetone; centrifugare 5 min 1000 x g;  
lavare con 100 ml di etere; centrifugare 5 min 1000 x g

SOPRANATANTE (scartato) . . . . .

PRECIPITATO

seccare sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**POLISACCARIDE PURIFICATO**

ca. 50 % di resa, calcolata rispetto al contenuto di polisaccaride del mezzo di coltura fluido, dopo eliminazione delle cellule.

## BIBLIOGRAFIA

1. MASTRANTONIO GIANFRILLI, P., LUZZI, I., OCCHIONERO, M., ZAMPIERI, A., PETRIACCI, D. 1978. Relazione conclusiva dell'indagine sui portatori sani di *N. meningitidis* svolta in Italia negli anni 1976-1977. Laboratori di Malattie Batteriche e Virali e di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
2. GOTSCHLICH, E. A., GOLDSCHNEIDER, I. & ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of the group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J. Exp. Med.* **129**: 1367-1384.
3. GOLDSCHNEIDER, I., GOTSCHLICH, E. C. & ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.* **129**: 1307-1326.
4. GOLDSCHNEIDER, I., GOTSCHLICH, E. C. & ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.* **129**: 1327-1348.
5. GOTSCHLICH, E. C., GOLDSCHNEIDER, I., LEPOW, M. L. & GOLD, R. 1977. The immune response to bacterial polysaccharides in man. In: *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber, E. & Krause, R. M. (Eds.), Raven Press, New York.
6. Report of a WHO Study Group on Cerebrospinal Meningitis Control. 1976. Technical Report Series n. 588, World Health Organization, Geneva.
7. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 1976. Twenty-seventh Report. Technical Report Series n. 594, World Health Organization, Geneva.
8. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 1976. Twenty-eight Report. Technical Report Series n. 610, World Health Organization, Geneva.
9. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for Meningococcal Polysaccharide Vaccine. WHO/BS/77.1166, Geneva, 6-12 Dec. 1977.
10. GOTSCHLICH, E. C., REY, M., TRIAU, R., SPARKS, K. J. 1972. Quantitative determination of the human immune response to immunization with meningococcal vaccines. *J. Clin. Invest.* **51**: 89-96.
11. GOTSCHLICH, E. C., LIU, T.-Y. & ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.* **129**: 1349-1365.
12. WATSON, R. G. & SCHERF, H. W. 1958. The specific hapten of group C (group II  $\alpha$ ) meningococcus. *J. Immunol.* **81**: 331-336.
13. KABAT, E. A., KAISER, H. & SIKORSKI, H. 1944. Preparation of the type-specific polysaccharide of the type I meningococcus and a study of its effectiveness. *J. Exp. Med.* **80**: 299-307.
14. BUNDLE, D. R., JENNINGS, H. J. & KENNY, C. P. 1973. An improved procedure for the isolation of meningococcal polysaccharide antigens, and the structural determination of the antigen from serogroup X. *Carbohydr. Res.* **26**: 268-270.
15. BUNDLE, D. R., JENNINGS, H. J. & KENNY, C. P. 1974. Studies on the group-specific polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup X and an improved procedure for its isolation. *J. Biol. Chem.* **249**: 4797-4801.
16. ROBINSON, J. A. & APICELLA, M. A. 1970. Isolation and characterization of *Neisseria meningitidis* groups A, C, X, and Y polysaccharide antigens. *Infect. Immunol.* **1**: 8-14.

17. LIU T.-Y., GOTSCHLICH, E. G., JONSSON, E. K. & WYSOCKI, J. R. 1971. Studies on the meningococcal polysaccharides. I. Composition and chemical properties of the group A polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **246**: 2849-2858.
18. SEVAG, M. G. 1934. Eine neue physikalische Enteiweissungsmethode zur Darstellung Biologisch Wirksamer Substanzen. *Biochem. Z.* **273**: 419-429.
19. GOTSCHLICH, E. C., REY, M., ETIENNE, J., SANBORN, W. R., TRIAU, R. & CVJETA NOVIC, B. 1972. The immunological responses observed in field studies in Africa with group A meningococcal vaccine. *Progr. Immunobiol. Standard.* **5**: 485-491.
20. ROBBINS, J. B., SCHNEERSON, R., LIU, T.-Y., SCHIFFER, M. S., SCHIFFMAN, G., MYEROWITZ, R. L., MCCACKEN, G. H. JR., ØRSKOV J. & ØRSKOV, F. 1975. Cross-reacting bacterial antigens and immunity to disease caused by encapsulated bacteria. In: *The Immune System and Infectious Diseases*, Neter, E. & Milgrom, F. (Eds.), Karger, Basel, pp. 218-241.
21. TIESJEMA, R. 1976. Influence of additive for lyophilization on stability of polysaccharide vaccines. *1st International Conference on Immunity and Immunization in Cerebrospinal Meningitis*, Milano.
22. Code of Federal Regulations, Section 610. 13. Title 21, Food and Drugs (Department of Health, Education and Welfare, FDA, 1974).
23. AUERBACH, C., NEUMANN, L., TASSINARI, S. J. & LEHAY, D. 1961. Nuclear Engineering Department Report, Brookhaven National Laboratory, Upton, Long Island, New York, 705 (S60), p. 37.
24. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
25. MCKENZIE, H. A. & WALLACE, H. S. 1954. The Kjendahl determination of nitrogen: a critical study of digestion condition. Temperature, catalyst and oxidizing reagent. *Aust. J. Chem.* **7**: 55-70.
26. CHEN, P. S., JR., TORIBARA, T. Y. & WARNER, H. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**: 1756-1758.
27. LIU, T.-Y. 1972. Determination of sialic acid using an amino acid analyzer. 1972. *Methods Enzymol.* **18**: 48-54.
28. SVENNERHOLM, L. 1957. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim. Biophys. Acta.* **24**: 604-611.
29. WARREN, L. Thiobarbituric acid assay of sialic acids. 1963. *Methods Enzymol.* **6**: 463-473.
30. DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
31. INGLIS, A. S. Some studies in the microanalytical determination of acetyl groups. 1958. *Mikrochim. Acta.* **2**: 228-235.
32. WEISENBERG, E. 1947. Die Mikroanalytische Bestimmung von C-Methyl und Acetylgruppen. *Mikrochemie.* **33**: 51-69.
33. ELEK, A. & HARTE, R. A. 1936. The microestimation of acetyl groups. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **8**: 267-269.
34. HESTRIN, S. 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J. Biol. Chem.* **180**: 249-261.

35. LIU, T.-Y., GOTSCHLICH, E. C., DUNNE, F. T. & JONSSON, E. K. 1971. Studies on the meningococcal polysaccharides. II. Composition and chemical properties of the group C polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **246**: 4703-4712.
36. SMITH, I. C. P., JENNINGS, H. J. & DESLAURIERS, R. 1975. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance and the conformations of biological molecules. *Accounts Chem. Res.* **8**: 306-313.
37. JENNINGS, H. J., BHATTACHARJEE, A. K., BUNDLE, D. R., KENNY, C. P., MARTIN, A. & SMITH, I. C. P. 1977. Structures of the capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* as determined by <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *J. Infect. Dis.* **136**, Suppl. S78-83.
38. BUNDLE, D. R., SMITH, I. C. P. & JENNINGS, H. J. 1974. Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. *J. Biol. Chem.* **249**: 2275-2281.
39. BHATTACHARJEE, A. K., JENNINGS, H. J., KENNY, C. P., MARTIN, A., SMITH, I. C. P. 1975. Structural determination of the sialic polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *J. Biol. Chem.* **250**: 1926-1932.
40. BHATTACHARJEE, A. K., JENNINGS, H. J., KENNY, C. P., MARTIN, A. & SMITH, I. C. P. 1976. Structural determination of the polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups Y, W 135 and Bo. *Can. J. Biochem.* **54**: 1-8.
41. SCHERP, H. W. & RAKE, G. 1935. Studies on meningococcus infection. VIII. The type I specific substance. *J. Exp. Med.* **61**: 753-769.
42. BUNDLE, D. R., JENNINGS, H. J. & SMITH, I. C. P. 1973. The Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of 2-acetamido 2-deoxy-2-hexoses and some specifically deuterated, O-acetylated and phosphorylated derivatives. *Can. J. Chem.* **51**: 3812-3819.
43. LIU, T.-Y., DUNNE, F. T., GOTSCHLICH, E. C. Studies on meningococcal polysaccharides. III. Physical properties of the group A, B and C meningococcal polysaccharides. *Eur. J. Biochem.* (in stampa).
44. LIU, T.-Y., GOTSCHLICH, E. C., EGAN, W. and ROBBINS, J. B. 1977. Sialic acid-containing polysaccharides of *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* strain Bos-12: structure and immunology. *J. Infect. Dis.* **136**, Suppl. S71-77.
45. WONG, K. H., BARRERA, O., SUTTON, A., MAY, J., HOCHSTEIN, D. H., ROBBINS, J. D., ROBBINS, J. B. & PARKMAN, P. D. 1977. Standardization and control of meningococcal vaccines, group A and C polysaccharides. *J. Biol. Standard.* **5**, 197-215.
46. IKIĆ, D., PETRES, J. J. & FLEŠ, M. Investigation of stability of group A meningococcal polysaccharide by the light scattering method. *Bull. Scientif.*, Section A. Yugoslavia (in stampa).
47. WATSON, R. C., MARINETTI, G. V. & SCHERP, H. W. 1958. The specific hapten of group C (group II α) meningococcus. II. Chemical nature. *J. Immunol.* **81**: 337-344.
48. EVANS, J. R., ARTENSTEIN, M. S. & HUNTER, D. H. 1968. Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new groups. *Am. J. Epidemiol.* **87**: 643-646.
49. BHATTACHARJEE, A. K., JENNINGS, H. J., KENNY, C. P. 1974. Characterization of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid as a component of the capsular polysaccharide antigen from *Neisseria meningitidis* serogroups 29-E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**: 489-493.

50. JENNINGS, H. J., HAWES, G. B., ADAMS, G. A. & KENNY, C. P. 1973. The chemical composition and serological reactions of lipopolysaccharides from A, B, X and Y *Neisseria meningitidis*. *Can. J. Biochem.* **51**: 1347-1354.
51. APICELLA, M. A. 1974. Identification of a subgroup antigen on the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide. *J. Infect. Dis.* **129**: 147-153.
52. KABAT, E. A. In: *Polysaccharides in Biology*, Springer, G. F., Ed., Josiah Macy, Jr. Foundation, New York, N. Y., Chapter 1, pp. 54-55.
53. KABAT, E. A. & BEZER, A. E. 1958. The effect of variation in molecular weight on the antigenicity of dextran in man. *Arch. Biochem. Biophys.* **78**: 306-318.
54. HILLEMANN, M. R. Combined meningococcal polysaccharide vaccines. WHO Study Group on Cerebrospinal Meningitis Control. BAC/SG/75.3, Geneva, 27-31 Oct. 1975.
55. FRASCH, C. E. 1977. Role of protein serotype antigen in protection against disease due to *N. meningitidis*. *J. Infect. Dis.* **136**, Suppl., S84-90.
56. FRASCH, C. E. & CHAPMAN, S. S. 1973. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. III. Application of a new bactericidal-inhibition technique to distribution of serotypes among cases and carriers. *J. Infect. Dis.* **127**, 149-154.
57. BRANDT, B. L., WYLE, F. A. & ARTENSTEIN, M. S. 1972. A radioactive antigen binding assay for *N. meningitidis* polysaccharide antibody. *J. Immunol.* **108**: 913-920.
58. BRANDT, B. L. & ARTENSTEIN, M. S. 1975. Duration of antibody response after vaccination with group C *Neisseria meningitidis* polysaccharide. *J. Infect. Dis.* **131**, Suppl. S69-72.
59. BEUVERY, E. C., VAN DELFT, R. W. & TIESJEMA, R. H. The detection of polysaccharide antigens and antibodies against polysaccharide antigens by means of the ELISA technique. *2nd International Conference on Immunity and Immunization in Cerebrospinal Meningitis*, Torremolinos, 2-3 Nov. 1977.
60. BEUVERY, E. C., VAN ROSSUM, F. & TIESJEMA, R. H. Immunogenicity of polysaccharide antigens and polysaccharide-protein complexes in mice and rabbits. *2nd International Conference on Immunity and Immunization in Cerebrospinal Meningitis*, Torremolinos, 2-3 Nov. 1977.
61. FONTANGES, R., ROBERT, D., BENVENISTE, E., FOURNIER, J.-M. & LEMERCIER, G. 1977. La méningite cérébro-spinale expérimentale chez le singe babouin, vacciné ou non. *Med. Trop.* **37**: 171-178.
62. CHEN, F. C., TSCHARNUTER, W. T., SCHMIDT, D., CHU, B. & LIU, T.-Y. 1974. Measurements of diffusion coefficients of meningococcal polysaccharides by Optical Mixing-Spectroscopy. I. A preliminary characterization on the aggregation of the group C polysaccharide. *Biopolymers.* **13**: 2281-2292.
63. FUJIME, S., CHEN, F. C., CHU, B. & LIU, T.-Y. 1977. Characterization of meningococcal polysaccharides by Optical Mixing Spectroscopy. II. Effects of temperature, EDTA, and ionic strength on aggregation of group C polysaccharides in solution. *Biopolymers.* **16**: 945-963.
64. TSUNASHIMA, Y., MORO, K., CHU, B. & LIU, T.-Y. 1978. Characterization of group C meningococcal polysaccharide by light scattering spectroscopy. III. Determination of molecular weight, radius of gyration and translational diffusion coefficient. *Biopolymers.* **17**: 251-265.