

37. I. ARCHETTI e B. BABUDIERI. — **Ricerche sperimentali su di un vaccino antidermotifico in sospensione oleosa.**

Riassunto. — Gli AA. preparano un vaccino antidermotifico emulsionato con Bayol F ed Arlacel. Tale vaccino determina nella cavia una risposta immunitaria molto superiore a quella provocata dal comune vaccino in sospensione acquosa, ed anche una maggiore resistenza alla infezione dermotifica sperimentale.

Un vaccino preparato con la medesima tecnica, ma incompletamente emulsionato, dà risultati notevolmente inferiori.

Un vaccino emulsionato con altro olio minerale, simile ma non eguale al Bayol F, dà risultati incostanti e nel complesso inferiori.

Il grado di immunità raggiunto è stato controllato sia con la deviazione del complemento, sia con la reazione d'agglutinazione secondo la tecnica di BABUDIERI e SECCHI. Il vaccino, se ben preparato, determina il massimo dell'immunità dopo due mesi; se mal preparato, dopo un mese.

Le due reazioni serologiche impiegate non hanno un comportamento parallelo. Gli anticorpi devianti il complemento declinano con rapidità notevolmente maggiore che quelli agglutinanti. L'infezione sperimentale degli animali vaccinati determina in genere un aumento del titolo della deviazione del complemento, mentre il titolo dell'agglutinazione resta immutato o addirittura diminuisce.

Résumé. — Les auteurs préparent un vaccin anti-dermotyphique émulsionné avec Bayol F et Arlacel. Ce vaccin cause chez le cobaye une réponse immunitaire bien supérieure à celle que provoque le vaccin ordinaire en suspension aqueuse, ainsi qu'une plus grande résistance à l'infection dermotyphique expérimentale.

Un vaccin préparé avec la même technique, mais incomplètement émulsionné, donne des résultats bien inférieurs.

Un vaccin émulsionné avec une autre huile minérale, semblable sans être égal au Bayol F, donne des résultats inconstants et en général inférieurs.

Le degré d'immunité obtenu a été contrôlé soit par la déviation du complément, soit par la réaction d'agglutination selon la technique BABUDIERI et SECCHI. Le vaccin, s'il est bien préparé, détermine le maximum d'immunité après deux mois, si mal préparé, après un mois.

Les deux réactions sérologiques employées n'ont pas un comportement parallèle. Les anticorps déviant le complément déclinent avec une

rapidité bien supérieure que les agglutinants. L'infection expérimentale des animaux vaccinés cause en général une augmentation du titre de la déviation du complément, tandis que le titre de l'agglutination reste le même ou diminue quelque peu.

Summary. — Anti-typhus vaccine was prepared emulsified in Bayol F and Arlacel. This vaccine produces a much better antibody response in guinea-pig than routine aqueous vaccine, besides providing greater resistance to experimental typhus infection.

Vaccine prepared with the same technique but incompletely emulsified gives considerably inferior results.

Vaccines emulsified with other types of mineral oil, similar to but not identical with Bayol F, give variable results, in general inferior.

The degree of immunization obtained was checked both by complement fixation and according to BABUDIERI and SECCHI's slide-agglutination technique. A well prepared vaccine gives maximum immunity after two months, a badly prepared one after one month.

The behaviour of the two serological reactions employed is not parallel. The disappearance of the complement-fixing antibodies is considerably more rapid than that of the agglutination antibodies. Experimental infection of vaccinated animals generally produces an increase in the complement-fixation and no change or an actual decrease in the agglutination.

Zusammenfassung. — Von den Verfassern wurde ein Antiflecktyphus-Impfstoff hergestellt, der mit Bayol F und Arlacel emulsioniert war. Bei Meerschweinchen erzeugt dieser Impfstoff eine weit höhere Immunität als der gewöhnliche Impfstoff in wässriger Suspension. Ausserdem ist auch der Widerstand gegen experimentelle Flecktyphusinfektion wesentlich grösser.

Ein nach dem gleichen Verfahren hergestellter Impfstoff, der jedoch nur unvollständig emulsioniert war, ergab wesentlich schlechtere Resultate.

Ein Impfstoff, der mit einem anderen Mineralöl emulsioniert wurde, das dem Bayol F ähnlich aber nicht gleich war, ergab unbeständige und im Durchschnitt schlechtere Resultate.

Der erzielte Immunitätsgrad wurde sowohl mittels der Ableitung des Komplements wie auch mittels der Agglutinationsreaktion nach dem Verfahren von BABUDIERI und SECCHI kontrolliert. Ist der Impfstoff gut vorbereitet, so wird der höchste Immunitätsgrad nach zwei Monaten, bei schlechter Vorbereitung hingegen nach einem Monat erreicht.

Die beiden serologischen Reaktionen, die hier zur Verwendung gelangen, zeigen kein paralleles Verhalten. Die Antikörper, die das Komplement binden, verlieren ihre Wirksamkeit wesentlich schneller als die agglutinierenden Antikörper. Die experimentelle Infektion der geimpften Tiere bedingt im allgemeinen eine Erhöhung des Ableitungsgrads des Komplements, während der Agglutinierungsgrad unverändert bleibt oder geradezu abnimmt.

Da alcuni anni è stato introdotto anche nella pratica della vaccinazione contro alcune malattie virali e particolarmente contro l'influenza l'uso di speciali vaccini, costituiti da una emulsione della sospensione dell'agente patogeno ucciso, con particolari olii minerali [SALK (¹)]. L'olio generalmente più usato è quello denominato Bayol F e ad esso viene aggiunto nella proporzione di 1:10, un dispersivo, più spesso l'Arlacel. Il principio su cui si basa questo tipo di vaccino è quello di impedire un rapido assorbimento dell'antigene, creando localmente un organo di produzione di anticorpi, che ha come conseguenza un notevole aumento del titolo degli anticorpi prodotti oltre che una maggiore durata dell'immunità determinata dalla vaccinazione stessa. I vaccini così preparati sono quindi in grado di determinare una immunità di più alto grado e di maggiore durata che i vaccini abituali. Essi non danno praticamente inconvenienti degni di nota.

Abbiamo voluto vedere se fosse possibile impiegare una tecnica simile a quella sopra esposta, per preparare un vaccino antidermotifico più attivo di quelli abituali.

Tecnica usata: Il vaccino antidermotifico è stato preparato con la tecnica abitualmente impiegata all'Istituto Superiore di Sanità. Il ceppo di *R. prowazeki* usato, è stato quello « Rabat ». Con una sospensione di rickettsie in soluzione fisiologica venivano infettati per via inalatoria e sotto narcosi, topini bianchi, che venivano sacrificati dopo 3-4 giorni; i polmoni venivano raccolti, controllati microscopicamente per accertare la presenza di numerose rickettsie e infine triturati. Sospesa in soluzione fisiologica formolata al 5‰ (10 cm³ per grammo di polmone), la miscela veniva quindi sottoposta a centrifugazione frazionata per purificare quanto più possibile il vaccino. Questo veniva infine sospeso in soluzione fisiologica formolata al 2‰, nella proporzione di 20 cm³ di soluzione per ogni 0,3 gr. di polmoni.

Per la preparazione del vaccino in sospensione oleosa, venivano mescolati, in parti uguali, il vaccino abituale ed una miscela costituita da

9 parti di Bayol F e da 1 parte di Arlacel opportunamente sterilizzati all'autoclave. L'omogeneizzazione della miscela veniva eseguita per mezzo di un apparecchio tipo « Turmix ». Si otteneva così una emulsione densa, d'aspetto biancastro, che manteneva inalterate le sue caratteri-

TABELLA 1.

Cavie I lotto	Titolo a 30 giorni dalla vaccinazione		Titolo a 60 giorni dalla vaccinazione		Titolo a 90 giorni dalla vaccinazione	
	d. c. (*)	a. (**)	d. c.	a.	d. c.	a.
1	1 : 64	1 : 1024	1 : 64	1 : 512	1 : 32	1 : 512
2	1 : 128	1 : 1024	1 : 1024	1 : 2048	1 : 256	1 : 1024
3	1 : 32	1 : 512	1 : 128	1 : 1024	1 : 32	1 : 512
4	1 : 16	1 : 64	1 : 32	1 : 256	1 : 32	1 : 512
5	1 : 64	1 : 128	1 : 512	1 : 1024	1 : 128	1 : 1024
6	1 : 8	1 : 32	1 : 64	1 : 256	1 : 32	1 : 512
7	1 : 64	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 32	1 : 256
8	1 : 64	1 : 512	1 : 256	1 : 2048	1 : 32	1 : 512
Valori medi	1 : 55	1 : 444	1 : 276	1 : 912	1 : 76	1 : 608
Cavie II lotto						
1	1 : 32	1 : 1024	1 : 64	1 : 512	1 : 64	1 : 256
2	1 : 64	1 : 128	1 : 128	1 : 256	1 : 128	1 : 256
3	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 64	1 : 512
4	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 128	1 : 128	1 : 256
5	1 : 128	1 : 64	1 : 512	1 : 512	1 : 128	1 : 512
6	1 : 128	1 : 1024	1 : 64	1 : 512	1 : 128	1 : 1024
7	1 : 64	1 : 64	1 : 512	1 : 256	1 : 128	1 : 256
Valori medi	1 : 66,3	1 : 347,4	1 : 237,7	1 : 457,1	1 : 109,7	1 : 438,9
Cavie III lotto						
1	1 : 16	—	< 1 : 4	1 : 16	—	—
2	1 : 8	—	1 : 4	1 : 32	—	—
3	1 : 8	—	1 : 4	1 : 16	—	—
4	< 1 : 4	—	< 1 : 4	—	—	—
5	1 : 8	—	—	—	—	—
6	< 1 : 4	—	—	—	—	—
7	1 : 8	—	—	—	—	—
Valori medi	1 : 6,9	—	1 : 2	1 : 21	—	—

(*) d.c. = deviazione del complemento.

(**) a. = agglutinazione.

Le cavie del I° lotto vennero inoculate con 0,25 cm³ e quelle del II° lotto con 0,5 cm³ del vaccino oleoso; le cavie del III° lotto con 0,5 cm³ di vaccino acquoso.

stiche fisiche anche per un periodo di parecchi mesi. E' da notarsi che il vaccino in sospensione oleosa così preparato ha, a parità di volume, un contenuto in rickettsie pari alla metà di quello del vaccino comune.

Preparato il vaccino, sono stati con esso inoculati per via intramuscolare due lotti di cavie, delle quali il primo ha ricevuto $0,25\text{ cm}^3$, il secondo $0,5\text{ cm}^3$. Un terzo lotto di cavie è stato inoculato, quale controllo, con $0,5\text{ cm}^3$ di vaccino antidermotifico comune, in sospensione acquosa. Ad intervalli scalari di tempo, gli animali sono stati salassati e sul loro siero è stata praticata sia la deviazione del complemento (antigene Lederle), sia la microagglutinazione con antigene preparato da uno di noi e seguendo la tecnica già usata da BABUDIERI e SECCHI nella serodiagnosi della febbre Q. I risultati ottenuti sono esposti nella Tab. I.

Dalla Tab. I risulta che mentre il vaccino in sospensione acquosa ha dato soltanto uno scarso movimento immunitario, il vaccino in sospensione oleosa ha dato una risposta incomparabilmente più rilevante, che ha raggiunto il suo culmine appena dopo 60 gg. e che ha iniziato la sua discesa in corrispondenza del terzo mese. E' da notarsi che il lotto delle cavie inoculate con $0,5\text{ cm}^3$ del vaccino oleoso non ha in complesso dato una risposta immunitaria maggiore di quella del lotto inoculato con $0,25\text{ cm}^3$; probabilmente con quest'ultima dose si è raggiunto l'optimum che il vaccino può dare. Degno di nota è anche il fatto che i titoli ottenuti con la reazione di agglutinazione sono stati più elevati che quelli dati dalla reazione di deviazione del complemento. Inoltre il loro declino è stato notevolmente più lento nel tempo e in ciò le due reazioni si sono comportate come BABUDIERI e SECCHI ⁽²⁾ avevano già osservato nella febbre Q.

Poichè è noto [SIEGERT e coll. ⁽³⁾] che nel campo delle rickettsiosi non sempre un titolo elevato delle reazioni serologiche è segno di una solida immunità rispetto all'infezione, a tre mesi di distanza dalla vaccinazione abbiamo inoculato le cavie dei tre lotti con una dose massiva di *R. prowazeki*.

Nella Fig. 1 riportiamo le medie delle temperature rettali giornaliere dei tre lotti di cavie, ad incominciare dal giorno seguente l'infezione. Come risulta dal grafico, le cavie vaccinate con il vaccino oleoso (I e II lotto) hanno avuto, in seguito alla infezione successiva, una risposta febbrile notevolmente meno elevata che le cavie che avevano ricevuto il vaccino acquoso (III lotto).

Ciò risulta ancor meglio se prendiamo in considerazione il numero degli animali-giornata che ha avuto temperature superiori ai 39° C .

E' da rilevarsi inoltre che del primo lotto un solo animale ebbe temperatura inferiore ai 37° C. e venne a morte; del secondo lotto nessuno ebbe ipotermia e del terzo ben tre animali ebbero temperature basse e due di essi morirono. Tali ipotermie sono, secondo ogni probabilità, da imputarsi ad infezione massiva da *R. prowazeki*.

Accenniamo qui ad una strana osservazione che abbiamo fatto su

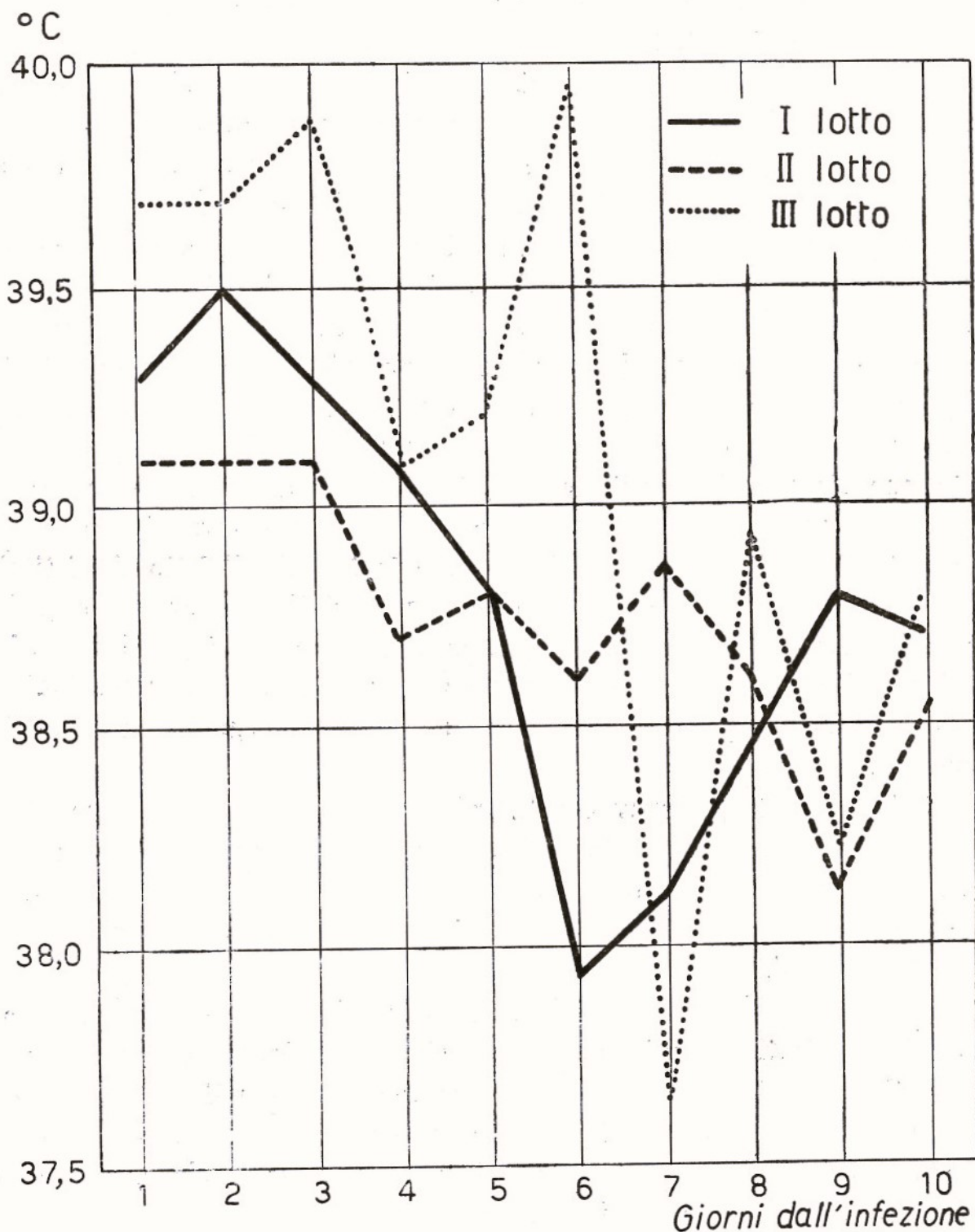


Fig. 1. - Media delle temperature rettali delle cavie vaccinate, dopo infezione con *R. prowazeki*.

	I lotto	II lotto	III lotto
animali-giornata a 40°	1	0	5
animali-giornata a 39,5°	6	4	11
animali-giornata a 39°	19	10	24

(N. B. - I tre lotti erano costituiti rispettivamente da 5, 4, 5 animali perchè le cavie mancanti erano venute a morte dopo l'ultimo salasso praticato per la serodiagnosi).

quattro delle cavie vaccinate con il vaccino oleoso, e sulle quali abbiamo ripetuto la serodiagnosi a 120 giorni dall'infezione. Abbiamo così notato che mentre il titolo della deviazione del complemento era in esse aumentato, e alle volte anche notevolmente (tranne una eccezione), il titolo dell'agglutinazione era invece aumentato in una sola, era rimasto immutato in una seconda, ed era addirittura diminuito nelle quattro rimanenti. In complesso la media dei titoli della deviazione del complemento era passata da 1:123 ad 1:864, e quella dei titoli della agglutinazione da 1:640 a 1:320. Nelle cavie vaccinate con il vaccino acquoso, erano invece aumentati sia il titolo della deviazione del complemento (media 1:266) sia quello dell'agglutinazione (media 1:347).

Allo scopo di controllare l'importanza di un emulsione perfetto del vaccino, abbiamo ripreparato con il medesimo vaccino acquoso impiegato nelle prove esposte sopra un nuovo lotto di vaccino in sospensione oleosa, omogeneizzandolo solo brevemente, sì che l'emulsione è risultata imperfetta.

Con questo vaccino abbiamo vaccinato 10 cavie. Cinque di queste hanno ricevuto una dose di 0,25 cm³ e 5 di 0,5 cm³. La risposta immunitaria è stata qui notevolmente inferiore a quella ottenuta con il vaccino ben omogeneizzato, e in alcuni casi, a tre mesi di distanza dalla vaccinazione, la reazione di deviazione del complemento dava titoli molto prossimi allo zero.

In questa tabella si nota che la dose maggiore ha dato risultati migliori dell'altra. Evidentemente qui con la dose di 0,25 cm³ non era stato ottenuto l'optimum dell'immunizzazione. Inoltre l'acme dei valori è stato qui raggiunto già nel primo mese, e non nel secondo come con il vaccino ben omogeneizzato. Anche in questo gruppo di animali si nota un andamento dissociato delle due reazioni serologiche impiegate. Inoltre si rileva che anche qui l'agglutinazione è più persistente della deviazione del complemento.

TABELLA 2.

Cavie (*)	Medie dei titoli a 30 giorni dalla vaccinazione		Medie dei titoli a 60 giorni dalla vaccinazione		Medie dei titoli a 90 giorni dalla vaccinazione	
	d. c.	a.	d. c.	a.	d. c.	a.
I° lotto cc 0,25	1 : 41,6	1 : 199,2	1 : 10,4	1 : 64	1 : 5,6	1 : 89,6
II° lotto cc 0,5	1 : 57,6	1 : 281,6	1 : 16	1 : 140,8	1 : 14,4	1 : 128

(*) Le cavie del I° lotto ricevettero una iniezione intramuscolare di 0,25 cm³ e quelle del II° lotto di 0,5 cm³ del vaccino oleoso.

In un'ultima prova ci siamo proposti di sostituire il Bayol F con un olio minerale di simili caratteristiche fisico-chimiche. A questo scopo ci siamo rivolti alla Direzione della Raffineria « Aquila » di Trieste, che qui ringraziamo per il cortese aiuto prestatoci. I tecnici della raffineria hanno esaminato allo spettrografo in campo ultrarosso il Bayol F ed hanno in seguito preparato un olio minerale che presentava uno spettro estremamente vicino a quello del Bayol F. Partendo allora da un nuovo lotto di vaccino antidermotifico poco attivo, abbiamo preparato due vaccini in sospensione oleosa, uno con il Bayol F più Arlacel, l'altro con olio « Aquila » più Arlacel. Le due emulsioni si presentavano molto ben omogeneizzate, però mentre quella preparata con il Bayol F si conservava inalterata per mesi, quella preparata con l'olio « Aquila » incominciava a stratificare già dopo poche ore. Con i due vaccini e con uno acquoso di controllo sono stati inoculati tre lotti di cavie, sui quali è stata praticata la sola deviazione del complemento 40 e 110 gg. dopo la vaccinazione. I risultati ottenuti sono esposti nella Tab. III.:

Come abbiamo detto, il vaccino da noi preparato era poco attivo, tanto che le cavie vaccinate con il vaccino acquoso non hanno mostrato alcun movimento immunitario. Quelle vaccinate con il vaccino con il Bayol F hanno dato invece una risposta abbastanza buona, pari pressochè, dopo 40 gg. a quella data dopo 30 gg. dagli altri vaccini oleosi da noi prima sperimentati.

Dopo 110 gg., in due delle cavie superstiti il titolo era ancora notevolmente elevato. Invece le cavie vaccinate con il vaccino all'olio « Aquila », si sono comportate in maniera molto incostante. Alcune di esse non hanno dato risposta immunitaria, altre l'hanno data solo molto tardivamente. Lo scarso numero di animali sopravvissuti dopo 110 gg. non ci

permette qui di trarre conclusioni definitive sull'efficacia di un vaccino così preparato. Ad ogni modo riteniamo di poter affermare che questa ultima prova ci dà una nuova conferma della necessità di usare un vaccino bene e stabilmente omogeneizzato, qualora si vogliano ottenere con costanza risultati soddisfacenti.

In appendice riferiamo che nel corso delle nostre esperienze, una delle cavia vaccinate ha partorito una caviotta. Il titolo del siero della madre era di 1:4 alla deviazione del complemento, e di 1:128 a quella

TABELLA 3.

L o t t i	Cavie	Titoli della deviazione del complemento	
		dopo 40 giorni	dopo 110 giorni
I° (vaccino acquoso)	1	< 1 : 4	< 1 : 4
	2	< 1 : 4	— (+)
	3	< 1 : 4	—
	4	< 1 : 4	< 1 : 4
	5	< 1 : 4	—
	6	< 1 : 4	< 1 : 4
	7	< 1 : 4	—
	8	< 1 : 4	< 1 : 4
II° (vaccino con Bayol F)	1	1 : 16	1 : 64
	2	1 : 8	< 1 : 4
	3	1 : 64	—
	4	1 : 64	1 : 128
	5	1 : 128	—
III° (vaccino con olio « Aquila »)	1	< 1 : 4	< 1 : 4
	2	< 1 : 4	1 : 32
	3	< 1 : 4	—
	4	< 1 : 4	—
	5	1 : 16	1 : 512
	6	1 : 32	< 1 : 4

(+): reazione non eseguita perchè l'animale era venuto a morte nell'intervallo tra il primo e il secondo salasso.

dell'agglutinazione. Il siero della cavietta ha dato invece risultato negativo alle due reazioni. Un'altra cavia ha partorito pure due caviette. La cavia era stata vaccinata con il vaccino oleoso (0,25 cm³ del vaccino ben omogeneizzato) ed era stata successivamente inoculata con una sospensione di *R. prowazeki* vivente. Il parto era avvenuto 19 gg. dopo l'infezione. Cinque gg. dopo la nascita una delle caviette ha dato un risultato negativo alle due seroreazioni; l'altra invece è stata negativa alla deviazione del complemento, ma positiva all'agglutinazione (1:64). Quindici giorni dopo la nascita, la prima cavietta ha dato il titolo di 1:8 alle due seroreazioni; la seconda invece ha dato il titolo di 1:16 alla deviazione del complemento, e di 1:32 all'agglutinazione. Il numero così limitato delle osservazioni non ci permette di dare una interpretazione sicura dei fatti. Riteniamo però probabile che gli anticorpi prodotti dal vaccino nella madre non abbiano attraversato la placenta. La risposta immunitaria dei neonati è stata probabilmente attiva piuttosto che passiva e dovuta a passaggio di rickettsie viventi dall'organismo materno a quello fetale.

In conclusione le nostre ricerche dimostrano che è possibile impiegare la tecnica di Salk per preparare un efficace vaccino antidermotifico. Affinchè però tale vaccino dia costantemente buoni risultati è indispensabile che l'omogeneizzazione del vaccino sia perfetta e che l'emulsione sia stabile.

Anche nel caso del dermatifo, come in quello di altre rickettsiosi, non c'è parallelismo fra reazione di deviazione del complemento ed agglutinazione. Quest'ultima reazione, se eseguita con la tecnica di BABUDIERI e SECCHI, dà titoli più elevati e più persistenti che la reazione di deviazione del complemento.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- ¹⁾ SALK J. E., LAURENT A. M. e BAILEY M. L.: Am. J. Pub. Health, 41: 669 (1951).
- ²⁾ BABUDIERI B. e SECCHI P.: Rend. Ist. Sup. Sanità, 13: 584-608 (1952).
- ³⁾ SIEGERT R., PETER H., SIMROCK W. e SCHWEINBERG H.: Arb. aus dem P. Ehrlich-Institut, 49: 162-171 (1952).