

37. SUL CONTROLLO DI EFFICACIA DEL SIERO ANTICARBONCHIOSO.

Il controllo del siero contro il Carbonchio Ematico che è obbligatorio nello Stato Italiano, non si giova come quelli di altri prodotti immunizzanti di un metodo standard universalmente riconosciuto ed uniformemente impiegato. Sono infatti note le difficoltà incontrate dai diversi ricercatori nel determinare con precisione il valore preventivo e curativo di questo siero. Ho perciò creduto di un certo interesse intraprendere alcune ricerche per stabilire possibilmente alcune modifiche al metodo originale di controllo ideato dallo Sclavo ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾. Questo A. al quale spetta il merito di avere per primo preparato il siero contro il carbonchio ematico eseguì la prime prove di titolazione nel coniglio, inoculando il germe ed il siero, dapprima nel sottocute; in un secondo tempo preferendo invece la via endovenosa. Volle usare anche la cavia ma constatò che è possibile proteggerla dall'infezione soltanto qualora si inietti ad essa un siero molto attivo ed un germe di una virulenza pari a quella del primo vaccino Pasteur. Da ultimo consigliò il seguente metodo di controllo; inoculare in vena a tre conigli del peso di 1.500 Kg., cc. 5 di siero e subito dopo sottocute cc. 0,5 di una emulsione ottenuta da una patina batterica di 24 h in 10 cc. di brodo. Viene considerato buono quel siero che salva almeno un coniglio e ritarda la morte degli altri per una durata di almeno 10 giorni mentre i controlli muoiono in circa 48 h.

Sobernheim ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ mise in rilievo il fatto che il siero molto spesso è incapace di proteggere il coniglio, il quale di conseguenza non sembra essere l'animale più adatto a questo genere di esperienze, ed egli preferì persino inoculare le pecore. Constatò che tutte quelle trattate con dosi da 15 a 200 cc. di siero, sopravvissero senza presentare notevoli disturbi alla successiva inoculazione di una coltura di Carbonchio che uccideva i testimoni in 2-3 giorni. Però in successive ricerche, usando un siero attivissimo, di pecora, riuscì a salvare tutti i conigli inoculati con virulentissime colture di Carbonchio, per cui nel dosaggio del potere preventivo del siero

egli ritornò al coniglio portando alcune modifiche al metodo Sclavo. Infatti egli inoculava in vena ad una serie di conigli 2-3-4-5-6 cc. di siero anticarbonchioso e ad alcuni testimoni siero normale di cavallo. Dopo un'ora iniettava sottocute da 1/1.000 a 1/10.000 di dose di una coltura in agar di carbonchio. Considerava buono quel siero che proteggeva due o tre conigli e riusciva a ritardare la morte degli altri in confronto ai testimoni.

Un altro metodo di controllo fu proposto da Mendez (⁸) (⁹). Questo A. inoculava sottocute a cavie dosi scalari di siero insieme a 1000 dosi m.m. di carbonchio attenuato; considerava come corrispondente a mezza unità immunizzante la dose di siero che prolungava la vita agli animali da 6 a 8 ore rispetto ai testimoni.

Altre ricerche sull'efficacia del siero anticarbonchioso nei vari animali d'esperienza sono state eseguite da Marchoux (¹⁰), Sawchenko (¹¹), Sanfelice (¹²), Deusch (¹³), Schubert (¹⁴), Ottolenghi (¹⁵), Ascoli (¹⁶) ecc. Dal complesso di queste ricerche risulta la difficoltà di dosare l'efficacia di un siero anticarbonchioso mediante le prove del suo potere protettivo sui piccoli animali e ciò per la grande variabilità che nei singoli casi presentano i vari fattori in gioco nell'esperienza: virulenza della coltura, recettività dell'animale ecc. Perciò alcuni AA. tentarono di girare queste difficoltà istituendo metodi di controllo completamente diversi dai precedenti. Così Mikaiesti (¹⁷), determina il titolo di un siero in vitro col metodo delle precipitazioni. Confrontando i risultati ottenuti con tale metodo con l'esito delle prove contemporaneamente eseguite sugli animali, egli constatò che esiste un netto parallelismo fra le prove. Egli afferma, in base a tali ricerche, che le dosi troppo elevate di un siero ricco di anticorpi precipitanti esercita un'azione sfavorevole sull'evoluzione dell'infezione, mentre la stessa quantità di siero povero di anticorpi precipitanti sembra eserciti in certi casi un'azione protettiva più elevata. Braga (¹⁸), tenta di dosare l'attività del siero ricercando in questo i vari anticorpi (anticorpi devianti il complemento; agglutinine, precipitine); egli constatò però che tale procedimento non porta a buoni risultati perchè non esiste sempre parallelismo fra attività di un siero e suo contenuto in anticorpi.

Durante una lunga serie di controlli eseguiti sui sieri anticarbonchiosi provenienti dai diversi Istituti produttori italiani, avevo più volte

constatato la difficoltà di dosare con precisione il siero con alcuni dei metodi sopra descritti. Queste difficoltà consistevano essenzialmente nei due seguenti fattori: virulenza e dose della cultura batterica da inoculare ai conigli. Per poter giungere nei vari controlli a risultati confrontabili fra loro, è evidentemente necessario che tali due fattori rimangano del tutto invariati.

Nei riguardi della variazione di virulenza avevo notato differenze nei risultati anche quando usavo lo stesso ceppo coltivato in brodo di carne. Ciò si spiega facilmente perchè è impossibile produrre successivamente dei brodi di carne identici fra di loro, cosichè la crescita delle culture presenterà sempre delle irregolarità. Queste irregolarità saranno ancora più notevoli nel trapianto in serie delle culture poichè è impossibile dosare con precisione la quantità dei germi da insemnare. Forse i risultati sarebbero stati più precisi se avessi usato sempre lo stesso terreno preparato una volta tanto e poi conservato. Comunque, le colture in brodo sono da escludersi perchè contengono numerose forme vegetative e poche spore, e ciò ha il suo valore perchè le spore conservano meglio la loro virulenza.

Io ho avuto l'occasione di constatare che un ceppo di C. E. coltivato in brodo di carne equina perde piuttosto rapidamente la sua virulenza. Mentre infatti in origine uccideva i conigli di 1,500 Kg. alla diluizione di 1:5000, dopo l'anno non li uccideva più neppure a 1:1000, e dopo 18 mesi la dose m.m. era appena quella di 1/8 di cc. Lo Sclavo (4) stesso del resto ammetteva che fra le cause che possono determinare l'incostanza dei risultati vi sono: l'impossibilità di dosare direttamente il numero dei germi che si iniettano e le variazioni della virulenza del germe. In quanto al dosaggio del numero dei germi da inoculare nelle singole prove, l'uso delle ansate è evidentemente molto impreciso. Non si ottengono risultati migliori neppure preparando emulsioni in soluzione fisiologica di patine batteriche su agar poichè per ovvie ragioni il numero dei germi presenti varia di volta in volta. Ritenni quindi opportuno orientare i miei tentativi sullo studio della preparazione e conservazione in massa delle spore. Sarei in questo caso riuscito ad eseguire tutti i controlli di efficacia dei sieri anticarbonchiosi nelle stesse condizioni e a dare ad essi un giusto valore comparabile. Inoltre è da tenere presente che l'uso delle spore avvicina l'esperimento a quanto avviene nell'infezione naturale.

Il primo che tentò di conservare le spore carbonchiose fu il Cienkowsky (¹⁹), che nella preparazione dei vaccini anticarbonchiosi a lunga validità, sostituì le culture sporulate a quelle asporulate. Le spore venivano conservate in un mestruo composto di 40 parti di glicerina e 60 di soluzione fisiologica. Lo studio della conservazione delle spore virulenti di carbonchio fu eseguito successivamente da Velu (²⁰), che potè dimostrare che in un mestruo di soluzione fisiologica glicerinata al 60 %, le spore carbonchiose non solo sopravvivono per oltre 4 anni ma mantengono inalterata per almeno 3 anni la loro virulenza iniziale.

Basandomi su questi risultati ho proceduto alla preparazione delle spore carbonchiose nel seguente modo: ho insemensato in una bottiglia di Roux un ceppo di Carbonchio Ematico che avevo isolato dalla milza di un bue, e dopo una permanenza di 6 giorni a 37° e di altrettanti giorni a temperatura ambiente, per favorire la sporulazione, ho raccolto la patina batterica in 100 cc. di soluzione fisiologica contenuta in una bottiglia a tappo smerigliato.

Ho ucciso le eventuali forme bacillari ancora presenti tenendo la emulsione per un'ora a bagnomaria a 80°. Ho in seguito aggiunto il 60 % di glicerina sterile e dopo un lungo scuotimento ho distribuito il mestruo in fialette da 1 cc. che ho conservato in ghiacciaia. Ho eseguito quindi il conteggio delle spore contenute in 1 cc. di mestruo, insemenzando su piastre di agar 1 cc. delle diverse diluizioni in soluzione fisiologica, ed ho determinato la d.m.m. del ceppo, inoculando una serie di conigli del peso di circa Kg. 1,500 con un numero progressivo di spore.

Ho considerato d.m.m. quella che uccideva il coniglio in 4 giorni.

La sospensione di spore in glicerina così preparata conservata in ghiacciaia a +5° per 15 mesi non ha presentato dopo tale periodo alcuna variazione sia della carica batterica che della sua virulenza.

Non sembra però che in tutti i casi la virulenza delle spore così conservate si mantenga immutata per un lungo periodo di tempo.

Infatti in un altro caso la virulenza delle spore conservate in glicerina, è discesa dopo 15 mesi ad 1/3 del valore originario.

Quindi, dopo oltre un anno di conservazione delle spore, prima di iniziare un controllo, conviene sempre procedere ad un nuovo dosaggio della loro virulenza.

Attualmente è allo studio la conservazione delle spore nel vuoto fosforico e dai primi risultati ottenuti dopo 7 mesi dalla preparazione, pare che il metodo corrisponda ottimamente.

In seguito ho iniziato il controllo dei diversi sieri anticarbonchiosi seguendo il procedimento indicato nell'unito specchietto, tenendo presente che il peso dei conigli deve essere di Kg. 1,500 con una tolleranza in più o in meno di 50 grammi.

Data	N. D. dei conigli	Peso	Dose di siero inoculato in vena	Dose m.m. di C. E. inoc. sottocute 24h dopo il siero	Esito al 15° giorno
	1		5 cc.	5	Sopravvive
	2		5 cc.	5	»
	3		3 cc.	5	»
	4		3 cc.	5	»
	5		2 cc.	5	»
	6		2 cc.	5	»
<i>Controlli</i>					
	1		5 cc. (siero normale)	2	+ in 3 ^a 4 ^a giornata
	2		0,00	2	+ in 3 ^a 4 ^a giornata

Le diluizioni in soluzione fisiologica del mestruo glicerico di cui mi servo per la infezione dei conigli, prima di essere adoperate per questa prova sono da me sempre insemenate su piastre di agar per la determinazione della carica batterica. Soltanto quando dallo sviluppo delle colonie ho avuto la conferma che questa è invariata, procedo alla inoculazione del coniglio. Poichè allo stato di diluizione in soluzione fisiologica le spore potrebbero germinare e le forme vegetative così ottenute subire una variazione di virulenza e di numero, le diluizioni del mestruo in attesa di essere adoperate dopo l'allestimento delle piastre in agar vengono conservate in ghiacciaia a +5° e in tale stato, come ho potuto accertare con successivi conteggi su piastre di agar, il numero dei germi rimane invariato. Nella preparazione delle diluizioni per avere risultati esatti è opportuno usare quantità forti di liquido. A questo scopo noi usiamo bottiglie a tappo smerigliato della capacità di circa 200 cc. contenenti 99 cc. di

soluzione fisiologica. Immettendo in una di queste bottiglie un cc. del liquido da esaminare, dopo lunga agitazione si ottiene una diluizione all' 1 % che è notevolmente esatta. Per le diluizioni progressive vengono usate pipette nuove e altre bottiglie contenenti soluzione fisiologica nella quantità di 90 o 99 cc. potendosi così avere diluizioni a 1:1.000; 1:10.000.

Usando questi procedimenti io ho eseguito in questi ultimi due anni diversi controlli di siero anticarbonchioso proveniente da tutti gli Istituti di produzione Italiani ed ho potuto constatare che il metodo corrisponde ottimamente. Infatti i conigli controllo sono sempre morti in terza o quarta giornata; non ho constatato fenomeni paradossi, nel senso di avere la morte di conigli trattati con dosi alte di siero e la sopravvivenza di quelli trattati con dosi minime, ed ho potuto determinare sempre con esattezza il valore immunizzante dei sieri esaminati, tanto da potere valutare sensibili differenze fra siero e siero e concludere senza tema di sbagliare per la loro approvazione o no. Come criterio di valutazione ho stabilito di considerare buono quel siero che anche alla dose di 2 cc. protegge il coniglio del peso di Kg. 1,500 dalla inoculazione sottocutanea di 5 dosi m.m. Deficiente quel siero che non protegge almeno 5 conigli sui 6 trattati.

RIASSUNTO

L'A. propone alcune modifiche al metodo di Sclavo sul dosaggio del Siero Anticarbonchioso. Egli consiglia l'uso di una sospensione glicerica di spore di carbonchio e fissa dosi ben determinate di spore e di siero nell'esecuzione delle prove.

SUMMARIUM

Suadet Auctor ut methodo illi, quam doctus vir Sclavo protulit, statuendi modum Sieri antianthraceutici, nonnulla temperamenta adhibeantur. Nam et censet carbunculi sporarum suspensione utendum esse glycerica, et experimentis faciendis certos quosdam sporarum serique statuit modos.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SCLAVO, « La sieroterapia del Carbonchio Ematico », Riv. d'Ig. e San. Pubbl., 9, 200 (1898).
- (²) SCLAVO, « La sieroterapia del Carbonchio Esterno dell'uomo », Riv. d'Ig. e San. Pubbl., 9, 814 (1898).
- (³) SCLAVO, « Delle iniezioni endovenose del Bacillo Carbonchioso », Riv. d'Ig. e San. Pubbl., 10, 562 (1899).
- (⁴) SCLAVO, « Nuove ricerche sperimentali sul potere curativo del siero anticarbonchioso », Riv. d'Ig. e San. Pubbl., 12, 212 (1901).
- (⁵) SCLAVO, « Il siero anticarbonchioso ed il suo impiego nella Medicina Umana e nella Medicina Veterinaria Lustig Malattie infettive dell'uomo e degli animali », II, 213 (1915), Vallardi, Milano.
- (⁶) SOBERNHEIM, « Ulteriori ricerche intorno all'immunità per il carbonchio », recensito in Riv. d'Ig. e San. Pubbl., 10, 795 (1899).
- (⁷) Citato dallo Sclavo vedi N. 4 e dal Gerlach in « La Standardisation des produits Biologiques », Bull. Off. Int. des Epizoot, 8, 156 (1934).
- (⁸) MENDEZ, « Das Serum gegen Milzbrand », C. f. Bakt. Parasit., 26, 599 (1899).
- (⁹) MENDEZ, « Ueber Milzbrandantitoxin », C. f. Bakt. Orig., 37, 405 (1904).
- (¹⁰) MARCHOUX, « Sérum Anticharbonneux », Ann. Inst. Past., 9, 785 (1895).
- (¹¹) SAWTCHENKO, « Contribution à l'étude de l'immunité », Ann. Inst. Past., 11, 865 (1897).
- (¹²) SANFELICE, « Untersuchungen ueber die Wirksamkeit des Milzbrandserum des Hundes als Schutz und Helmmittel », C. f. Bakt. Orig., 33, 61 (1903).
- (¹³) DEUTSCH, citato dall'Ascoli, vedi N. 15.
- (¹⁴) SCHUBERT, citato dall'Ascoli, vedi N. 15.
- (¹⁵) OTTOLENGHI, « Sul Carbonchio sperimentale nelle cavie e sul valore protettivo del siero Sclavo contro tale infezione », Atti R. Accad. dei Fisiocritici, Serie IV, 14, 320 (1902).
- (¹⁶) ASCOLI, « Sul dosaggio del siero anticarbonchioso », Ann. d'Ig. Sper., 16, 457 (1906).
- (¹⁷) MIKAIESTI, « Saggi del titolo del siero anticarbonchioso effettuati all'Istituto di Cantacuzene », Bull. Trimest. dell'Org. d'Ig., 7, 893 (1938).
- (¹⁸) BRAGA, « Sur le titrage du Serum Immunisant contre le charbon bactérien », Bull. Off. Int. des Epizoot, 19, 114 (1939).
- (¹⁹) CIENKOWSKY, citato dal Mirri in « Malattie infettive degli animali domestici », Arti grafiche Pezzino, Palermo (1940).
- (²⁰) VELU, « Longévité des spores de bacillus Anthracis en milieu glycérimé et standardisation des Vaccins Charbonneux », Comp. Ren. Soc. Biol., 108, 685 (1931).
-
-
-