

9. Leonardo LILLO. — Sull'anatossina difterica adsorbita con fosfato di alluminio.

Riassunto. — L'A. ha esaminato l'attività dell'anatossina difterica adsorbita con fosfato di alluminio secondo il metodo di Holt. A tale scopo ha inoculato cinque gruppi di venti cavie con dosi scalari di anatossina adsorbita e quattro gruppi con anatossina semplice. Ha tenuto gli animali in osservazione per 40 giorni e dopo tale periodo li ha inoculati con tossina difterica.

Dall'esame dei risultati è giunto alla conclusione che l'anatossina adsorbita è innocua ed è circa 200 volte più efficace dell'anatossina semplice.

Résumé. — L'A. a examiné l'activité de l'anatoxine diphtérique adsorbée par le phosphate d'aluminium suivant la méthode de Holt. A cet effet, il a inoculé cinq groupes, chacun de vingt cobayes, avec des doses graduelles d'anatoxine adsorbée et quatre groupes avec l'anatoxine simple. Il a tenu les animaux en observation pendant 40 jours, et après cette période il leur a inoculé de la toxine diphtérique.

Après examen des résultats, il a conclu que l'anatoxine adsorbée par la méthode ci-dessus indiquée n'est nullement dangereuse et est 200 fois plus efficace que l'anatoxine simple.

Summary. — The author has examined the activity of diphtheria anatoxin adsorbed on aluminium phosphate according to the method of Holt. Five groups of twenty guinea pigs were injected with graded doses of adsorbed anatoxin and four groups with ordinary anatoxin. After 40 days observation the animals were injected with diphtheria toxin. The results show that the adsorbed anatoxin is innocuous and about 200 times more effective than ordinary anatoxin.

Zusammenfassung. — Der V. hat die Aktivität des von Aluminiumphosphat adsorbierten Diphtherieantitoxins nach der Holtmethode geprüft. Zu diesem Zweck hat er 5 Gruppen zu je 20 Meerschweinchen mit Scala'dosen von adsorbiertem Antitoxin und 4 Gruppen mit einfachem Antitoxin geimpft. Die Tiere wurden 40 Tage lang unter Beobachtung gehalten und hernach mit Diphtherie - Toxin geimpft.

Durch die Prüfung der Ergebnisse kommt der V. zum Schluss, dass das adsorbierte Antitoxin unschädlich und ca. 200mal wirksamer als das einfache Antitoxin ist.

Da quando Ramon indicò nell'anatossina difterica il miglior mezzo per l'immunizzazione attiva contro la difterite, una serie infinita di studiosi si è occupata di ricercare i metodi più idonei per accrescerne il potere immunizzante.

L'importanza di queste ricerche consiste nel fatto che — come giustamente osserva il BOUSFIELD (1) — è molto facile proteggere un 90% di bambini, ma sono gli ultimi 10% circa (soggetti relativamente refrattari) che devono destare il nostro interesse a sviluppare profilattici assolutamente superiori, poichè probabilmente questo 10% corre il maggior pericolo d'infezione se non viene sapientemente immunizzato.

Così, partendo dal concetto — espresso da RAMON (2) — che la reazione di flocculazione può denunciarci facilmente e senza possibilità di errore il valore antigene dell'anatossina, si è cercato di produrre anatossine che avessero un numero sempre più elevato di unità flocculanti per cmc.; in tal modo — specialmente mediante opportune modifiche del terreno di cultura — fu possibile ottenere anatossine contenenti anche 40-50 U.F. per cmc. Se non che ricerche di vari AA. — fra cui PRIGGE (3) in Germania e CIANTINI (4) in Italia — misero in evidenza che il potere immunizzante dell'anatossina non era sempre in diretto rapporto con il numero di U.F. in essa contenute; d'altra parte POVITZKY ed EISNER (5) dimostrarono che si poteva ottenere una dissociazione fra potere antigene e potere flocculante; difatti, tenendo a temperatura ambiente un'anatossina a cui avevano aggiunto del fenolo, videro che questa perdeva quasi completamente il potere immunizzante, mentre il titolo flocculante rimaneva pressochè immutato.

Contemporaneamente però a tali ricerche, se ne svolgevano altre dirette ad aumentare l'attività dell'anatossina mediante l'adsorbimento. Le sostanze adoperate a questo scopo furono principalmente in un primo tempo l'allume potassico e poi l'ortoidrossido di alluminio preparato secondo il metodo Cy di WILSTÄTTER (6). L'anatossina così adsorbita fu denominata A.P.T. (Alum Precipitated Toxoid).

Prigge (7) afferma in base a prove sperimentali che l'aggiunta di allume all'anatossina la rende 110 volte più attiva, mentre da ricerche di BABUDIERI (8) risulta che l'anatossina adsorbita con ortoidrossido di alluminio è 250 volte più efficace dell'anatossina semplice.

Ma molte difficoltà si presentano per la preparazione di un A.P.T. avente un potere antigenico uniforme (HOLT (9)). Tali difficoltà derivano principalmente dalle nostre limitate conoscenze in merito alla sua esatta composizione, al meccanismo per cui il tossoide difterico precipitato, somministrato nella forma di A.P.T., dimostra una maggiore attività ed alla influenza delle impurezze sulla risposta dell'organismo. Le variazioni secondo GLENNY (10) sarebbero prodotte dalla diversità nei metodi di preparazione dell'A.P.T.: il tipo di terreno usato, la quantità aggiunta di allume po-

tassico e la susseguente preparazione e il lavaggio del precipitato che sono fatti in modo considerevolmente diverso nei diversi laboratori.

Per ovviare a questi inconvenienti, Holt ⁽¹¹⁾ ha cercato di preparare un nuovo profilattico avente « un'attività di immunizzazione almeno uguale a quella dello A.P.T., di qualità superiore ed avente una costanza di composizione che prima non si poteva raggiungere ».

Egli aveva notato che tanto l'idrossido di alluminio puro quanto il fosfato di alluminio puro precipitavano il tossoide antigene; ma, mentre il fosfato di alluminio precipitava solo le proteine, l'idrossido di alluminio precipitava pure peptoni ed aminoacidi dando luogo ad un vaccino di attività molto variabile — anche se apparentemente di composizione costante — e che poteva anche provocare delle reazioni di carattere non specifico ⁽¹²⁾.

Partendo da tali premesse, Holt preparò un campione di fosfato di alluminio puro con quantità equimolecolari di cloruro di alluminio e fosfato trisodico, in modo da produrre una sospensione di fosfato di alluminio di 3 mgr. per cmc. A questa sospensione aggiunse una quantità di tossoide purificato e concentrato contenente 50 U.F. (*unità flocculanti*) e lasciò la miscela a riposo per 24 ore. Il successivo esame del preparato mostrò che nel liquido sovrastante non vi erano tracce di tossoide, che invece era tutto nel deposito, separato per centrifugazione. Chiamò questo prodotto P.T.A.P. (*purified toxoid, aluminium phosphate precipitated*). Prove sperimentali ne dimostrarono l'efficacia — in quanto era sufficiente 1 U.F. di P.T.A.P., diluito in 1 cmc. di NaCl, inoculato alle cavie, per produrre una solida immunità — e la stabilità, poichè, conservato in ghiacciaia per due anni, manteneva intatto il potere immunizzante, ed a temperatura ambiente in un anno perdeva solo il 10% delle U.F. in esso contenute, [l'A.P.T. invece è instabile ad una lunga conservazione (HARTLEY ¹³)]; risultati ancora migliori (tanto da poterlo adoperare come standard) si ottengono conservando il tossoide purificato ed essiccato e sciogliendolo al momento dell'uso con una sospensione di fosfato di alluminio puro preparato di fresco.

D'altra parte l'inoculazione del preparato a bambini ed adulti Schick positivi non ha dato luogo a reazioni degne di nota.

Successive ricerche sperimentali dello stesso A. accertarono che l'optimum di supporto minerale da aggiungere al tossoide purificato per avere una produzione massima di antitossina nelle cavie è di circa mgr. 2,75 di fosfato di alluminio per ciascuna iniezione adoperando 1 Lf. di tossoide e facendo 2 iniezioni a distanza di 14 giorni; se invece si pratica una sola iniezione, bisogna aumentare considerevolmente la quantità di fosfato di alluminio per avere una buona risposta immunitaria.

Tali risultati furono confermati da Pousfield ⁽¹⁴⁾ il quale, immunizzando dei bambini con una sola iniezione da 0,5 cmc. di un P.T.A.P. contenente 10 Lf. di tossoide per cmc. e dosi scalari di fosfato di alluminio

(fino ad un massimo di 15 mgr. per cmc.), trovò che, aumentando la quantità di fosfato di alluminio, aumentava la percentuale di bambini che divenivano Schik negativi. Lo stesso A. (1) poi ripetendo la reazione di Schik a dei bambini che erano stati immunizzati 2 anni prima con 2 iniezioni di anatossina precipitata con fosfato di alluminio, trovò che se il fosfato era stato aggiunto in quantità sufficiente (almeno 3,6 mgr. per cmc.) il 100% di bambini si mantenevano Schik negativi.

In base quindi alle ricerche finora eseguite, HOLT (15-16) crede di poter concludere:

a) « 0,5 — 1 unità di anatossina danno la risposta massima nelle cavie e 1 — 2 unità sono con ogni probabilità sufficienti per la profilassi nell'uomo, quando vengono unite con 5 mgr. di fosfato di alluminio ».

b) Il P.T.A.P. è un vaccino profilattico di composizione esatta e di attività antigene esattamente riproducibile che, contenendo la quantità ottimale di sostanza attivante, ci permette di usare la quantità minima di antigene purificato.

c) Il P.T.A.P. ha un potere immunizzante circa 1.000 volte maggiore di quello dell'anatossina bruta.

L'importanza di queste conclusioni non ha bisogno di essere messa in evidenza; e, poichè la loro conferma potrebbe indurre a sostituire vantaggiosamente il P.T.A.P. alla comune anatossina nella pratica della vaccinazione antidifterica, ho voluto saggiarne l'innocuità ed il potere immunizzante mediante prove sperimentali nelle cavie tenendo anche presenti le norme vigenti sul controllo di Stato dei vaccini antidifterici. A tale scopo ho cercato di confrontare il potere immunizzante di una comune anatossina difterica avente una discreta attività antigene e 42 unità flocculanti per cmc. con un P.T.A.P. contenenti 10 mgr. di fosfato di alluminio e 20 U.F. per cmc. Ho adoperato 9 gruppi di 20 cavie ciascuno; ai primi 4 gruppi ho inoculato rispettivamente 0,5 - 1 - 2 - 5 cmc. di anatossina difterica, agli altri 5 gruppi 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 0,5 cmc. di P.T.A.P.; il P.T.A.P. inoculato ai primi tre gruppi era diluito in soluzione fisiologica fino a 0,5 cmc. Dopo 40 giorni venivano inoculate alle cavie 100 dmm. di tossina difterica eccetto che per l'ultimo gruppo al quale invece vennero inoculate 1.000 dmm. di tossina. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

ANATOSSINA DIFTERICA

Gruppi	Cavie inoculate	Quantità di anatossina difterica inoculata	Morte per malattie intercorrenti	Cavie residue	Tossina inoculata	Morte per intossicazione difterica	Sopravvissute	
							con disturbi locali	senza segni di sofferenza
1	20	0,5 cc.	—	20	100 dmm.	19=95%	1=5%	—
2	20	1 cc.	4	16	»	14=88%	2=12%	—
3	20	2 cc.	2	18	»	13=73%	5=27%	—
4	20	5 cc.	1	19	»	3=16%	4=21%	12=63%

P. T. A. P.

Gruppi	Cavie inoculate	Quantità di P.T.A.P. inocu'ato	Morte per malattie intercorrenti	Cavie residue	Tossina inoculata	Morte per intossicazione difterica	Sopravvissute	
							con disturbi locali	senza segni di sofferenza
5	20	0,1 cc.	—	20	100 dmm.	18=90 ⁰ / ₀	2=10 ⁰ / ₀	—
6	20	0,5 cc.	—	20	»	2=10 ⁰ / ₀	8=40 ⁰ / ₀	10=50 ⁰ / ₀
7	20	0,1 cc.	2	18	»	—	6=33 ⁰ / ₀	12=67 ⁰ / ₀
8	20	0,5 cc.	2	18	»	—	4=22 ⁰ / ₀	14=78 ⁰ / ₀
9	20	0,5 cc.	2	18	1000 dmm.	—	8=45 ⁰ / ₀	10=55 ⁰ / ₀

Le cavie sopravvissute dei gruppi 5-6-7-8-9 furono tenute in osservazione per altri 3 mesi, trascorsi i quali, vennero riinoculate con 100 dosi dmm. di tossina difterica. Sopravvissero senza alcun disturbo locale tutte eccetto le due del gruppo cinque per le quali si notò un'infiltrazione edematosa nella zona di inoculazione. L'immunizzazione provocata dal P.T.A.P. si era perciò mantenuta intatta, anzi era stata rafforzata presumibilmente dalla tossina iniettata 40 giorni dopo.

Nel corso dell'esperimento si poté notare come le cavie, tenute costantemente in osservazione e pesate regolarmente ogni settimana, non manifestassero alcun segno di sofferenza e crescessero regolarmente di peso; solo le cavie dei gruppi 8-9 e — in misura minore — quelle del gruppo 7 presentarono un nodulo infiltrativo nella zona del sottocutaneo dove era stato inoculato il P.T.A.P.; tali noduli si assorbono molto lentamente e furono ben tollerati; qualcuno di essi manifestò scarsi segni di reazione infiammatoria, nessuno per altro accennò ad evolvere verso una forma suppurativa.

I noduli che si formano quando vengono inoculate delle anatossine precipitate spiegherebbero il maggior potere immunizzante di tali anatossine in quanto l'antigene verrebbe liberato ed entrerebbe in circolo molto lentamente, costituendo per l'organismo uno stimolo promulgato. Bousfield osserva che l'incapsulazione e l'occlusione del profilattico rispetto ai sistemi circolatorio e linfatico certamente avvengono con buona rapidità e il profilattico così racchiuso non porta più alcun contributo di utilità; quindi appare probabile che solo la porzione di tossoide precipitato che è vicina alla periferia della prima reazione infiammatoria viene utilizzata per un'azione prolungata e perciò il dosaggio in Lf. necessario per fornire uno stimolo è estremamente piccolo.

Per spiegare questo fenomeno ZIRONI ⁽¹⁷⁾ riferiva delle ricerche di Magrassi il quale, inoculando in più volte (7 circa), nello stesso punto della cute, minime quantità di anatossina (la somma delle quantità somministrate non superava 1/50 circa di U.F'), riusciva ad ottenere nelle cavie « una produzione di antitossina superiore a quella di dosi 1000 e persino 100.000 volte più grandi inoculate una sola volta nel sottocutaneo ». In base a tali ricerche Zironi pensava che le piccolissime dosi di anatossina inoculate, agendo

sulle stesse cellule, in un primo tempo facessero insorgere uno stato iniziale di immunità e poi scatenassero una forte reazione da parte delle cellule divenute ipersensibili e iperattive.

L'anatossina di Holt agirebbe con lo stesso meccanismo: essa si liberebbe lentamente dai granuli del fosfato di alluminio e si fisserebbe in parte sulle cellule circostanti; una piccola parte arriverebbe attraverso i linfatici alle linfoghiandole viciniori ed una quantità ancora minore passerebbe nel sangue. Tali piccole quantità di anatossina in un primo tempo sensibilizzerebbero un limitato numero di cellule, poi, continuando ad arrivare ad esse, scatenerebbero la produzione di anaticorpi.

C O N C L U S I O N I

In base alle ricerche da me eseguite, mi sembra di poter trarre le seguenti conclusioni:

1) Il P.T.A.P. si può considerare innocuo e generalmente non dà forti reazioni generali o locali. I piccoli noduli che si formano nel punto di inoculazione potrebbero provocare nella vaccinazione umana un qualche fastidio, ma nel corso degli esperimenti non hanno mai manifestato alcuna tendenza ad evolvere verso forme suppurative.

2) Dai risultati ottenuti il P.T.A.P. appare 200 volte circa più attivo dell'anatossina difterica.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia 8-7-49.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BOUSFIELD, G., The Lancet Dec. 13 p. 867 (1947).
- (2) RAMON G., Ann. Ist. Pasteur T. 39 p. 1^a, pag. 1 (1925).
- (3) PRIGGE R., Deutsche Med. Woch. Vol. 1, pag. 217 (1936) - Vol. II. pag. 894 (1937).
- (4) CIANTINI, Boll. Ist. Sieroterapico Mil., pag. 233-410 (1941).
- (5) POVITZKY e EISNER, citato da Babudieri.
- (6) WILLSTÄTTER R. e C., Ber. Dtsch. Chem. V. 58, p. 2448 (1925).
- (7) PRIGGE R., citato da Babudieri.
- (8) BABUDIERI B., Rendiconti Istituto Superiore di Sanità, Vol. V, parte III, pagina 950 (1942).
- (9) LEWIS HOLT B., The Lancet March 8, pag. 282 (1947).
- (10) GLENNY, citato da Lewis - Principles and Practice of Diphtheria immunisation pag 30 (1941).
- (11) HOLT L. B., lavoro citato.
- (12) HOLT L. B., suppl. riv. Ist. Sier. Italiano Vol. 2-3 N. 2, pag. 1 (1948).
- (13) HARTLEY, P., proc. R. Soc. Med. 38, 473 (1945).
- (14) BOUSFIELD G., The Lancet N. VIII - Vol. I, pag. 286 (1947).
- (15) HOLT L. B., suppl. riv. Sier. Italiano - Vol. 2-3 N. 2, pag. 17 (1948).
- (16) HOLT L. B., riv. Ist. Sier. Italiano - Sez. II Vol. 22 N. 4, pag. 199 (1948).
- (17) ZIRONI A., riv. Ist. Sier. Italiano - Sez. II Vol. 23 N. 3, pag. 141 (1948).