91. I. ARCHETTI. — Ricerche di laboratorio in seguito a vaccinazione contro l'influenza. (*)

Riassunto. — Sono esposti i risultati ottenuti durante una prova di vaccinazione con diversi tipi di vaccino influenzale monovalente. I sieri dei vaccinati sono stati studiati sia mediante la prova della inibizione della emoagglutinazione, sia con la prova di neutralizzazione *in ovo*.

I dati desunti da questo studio mentre in parte concordano fra di loro, pongono in evidenza la notevole diversità fra l'aumento degli anticorpi misurati *in vitro* e quelli misurati *in vivo*, differenza che dimostrerebbe una volta di più come con queste tecniche noi misuriamo probabilmente anticorpi diversi.

Résumé. — On expose les résultats obtenus pendant un essai de vaccination avec différents types de vaccin monovalent antigrippal. On a étudié le sérum des vaccinés soit par le moyen de la reaction d'inhibition de l'hémagglutination, soit par celui de la neutralisation *in ovo*.

Les données résultant de cette étude tandis qu'elles concordent en partie entre elles, mettent cependant en évidence la diversité entre l'augmentation des anticorps mesurés *in vitro* et ceux mesurés *in vivo*, différence qui tendrait à démontrer une fois de plus comment avec ces techniques nous mesurons probablement des anticorps différents.

Summary. — Results obtained during a vaccination trial with different types of monovalent influenza vaccine are described. The sera of subjects vaccinated were studied either by the haemoagglutination-inhibition test, or by the neutralization test *in ovo*.

The data induced from this study, while partly in agreement among themselves, illustrate the remarkable diversity between increase of antibodies when measured *in vitro* and *in vivo*. This difference once more demonstrates that with these techniques we are probably measuring different antibodies.

Zusammenfassung. — Erwähnt es werden die Ergebnisse, die bei Impfversuchen mit verschiedenen Typen von einwertigen Influenza-Vaccinen erzielt wurden. Die Seren der geimpften Personen wurden

---

(*) Comunicazione tenuta al VI Congresso Internazionale di Microbiologia - Roma, 6-12 settembre 1953.

sowohl mit dem Hämagglutinations-Hemmungstest wie auch mit dem Neutralisationstest *in ovo* untersucht.

Die so erhaltenen Ergebnisse stimmen zwar teilweise miteinander überein, zeigen jedoch einen erheblichen Messungsunterschied der Vermehrung der Antikörper bei der Messung *in vitro* und der Messung *in vivo*. Dieser Unterschied würde einmal mehr zeigen, dass mit diesen Verfahren wahrscheinlich verschiedene Antikörper gemessen werden.

Il Centro mondiale per l'influenza di Londra progettò nel 1952 alcune prove su piccola scala con vaccini antinfluenzali, allo scopo di comparare fra di loro diverse preparazioni di vaccino, differenti metodi di somministrazione o diverse dosi.

Poichè il Centro italiano per l'influenza dell'Istituto Superiore di Sanità prese parte a questo piano di esperimenti, ci vennero inviati quattro campioni di vaccino contrassegnati ciascuno con una lettera dell'alfabeto e precisamente vaccini E, F, G, H.

Tutti i vaccini erano stati preparati dal dr. Himmelweit, secondo il suo metodo di adsorbimento del virus su fosfato di alluminio (1), usando ceppi del tipo A: E ed F partendo dal ceppo A/England/1/51; G ed H dal ceppo FM1. I vaccini F ed H erano stati concentrati tre volte più dei corrispondenti originali mediante centrifugazione. Circa 200 soldati vennero da noi vaccinati con una iniezione sottocutanea di 1 cc di vaccino durante un periodo in cui non vi è stata localmente alcuna epidemia: 50 individui per ogni gruppo. Non si rilevò alcuna particolare reazione nè locale nè generale.

Per stabilire l'efficacia dei vaccini, venne calcolato l'aumento di anticorpi 14 giorni dopo la vaccinazione per mezzo della prova di inibizione della emoagglutinazione, usando il metodo delle piastre di sostanza plastica, così come descritto in una nota inviata dal Centro mondiale per l'influenza. (W I C/C 7).

A 0,25 cc di diluizioni seriali di siero, inattivato con il riscaldamento a 56° per 30' e cominciando da una diluizione iniziale di 1:10, si aggiungono 0,25 cc di una sospensione 0,5% di globuli rossi di pollo ed immediatamente dopo 0,25 cc di una diluizione di virus tale da contenere 16 dosi agglutinanti per 0,25 cc. I risultati si leggono dopo 1 ora. L'inibitore aspecifico presente nel siero non venne distrutto.

I dati delle reazioni di inibizione della emoagglutinazione sono raccolti nella Tab. I e nella Fig. 1.

---

(1) Appleby J. C., Himmelweit F. e Stuart-Harris C. H. - Lancet *1*, 1384 (1951).

TABELLA 1.

Aumento medio degli anticorpi inibenti l'emoagglutinazione nei soldati vaccinati.

Vaccino	Numero dei sieri esaminati	Ceppo (*)					
		A: England/1/51			FM1		
		I° siero	II° siero (+)	Aumento volte	I° siero	II° siero (+)	Aumento volte
E (00)	49	21 (§)	49	2,3	32	83	2.5
F (++)	48	15,5	97	6,2	16	155	9,7
G	44	16	37	2,3	23	130	5,7
H	47	11	24	2,2	15	104	6,9

(*) 16 unità iniziali di virus.
(+) Preso 14 giorni dopo la vaccinazione.
(00) Il test con FM1 venne fatto soltanto sul siero di 37 individui.
(§) Il titolo è espresso come il reciproco del valore medio delle diluizioni iniziali del siero.
(++) Il test con FM1 venne fatto soltanto sul siero di 36 individui.

In base ad essi si possono fare alcuni rilievi:

1) con il vaccino E si ottiene un aumento di anticorpi presso a poco identico sia verso il ceppo omologo come verso quello eterologo;

2) il vaccino F, tre volte più concentrato di quello E, determina un aumento di circa tre volte maggiore, verso entrambi i ceppi;

3) con il vaccino G l'aumento degli anticorpi è scarso se si considera il ceppo eterologo, mentre è sufficientemente alto se si considera quello omologo;

4) l'aumento in anticorpi determinato dal vaccino H, tre volte più concentrato di quello G, è quasi identico all'aumento ottenuto con il vaccino originale, come se la concentrazione del virus non avesse avuto alcun effetto.

Poichè i risultati ottenuti usando gli stessi vaccini da diversi ricercatori italiani e stranieri partecipanti alle medesime prove, furono alquanto diversi, sembrò cosa utile eseguire un certo numero di titolazioni degli anticorpi neutralizzanti, in modo da potere comparare tra di loro i dati ricavati mediante le due differenti tecniche. A questo scopo si seguì il metodo descritto da WALKER e HORSFALL (2) della neutralizzazione *in ovo*.

(2) WALKER D. L. e HORSFALL F. L. jr. - J. exp. Med. *91*, 159 (1950).

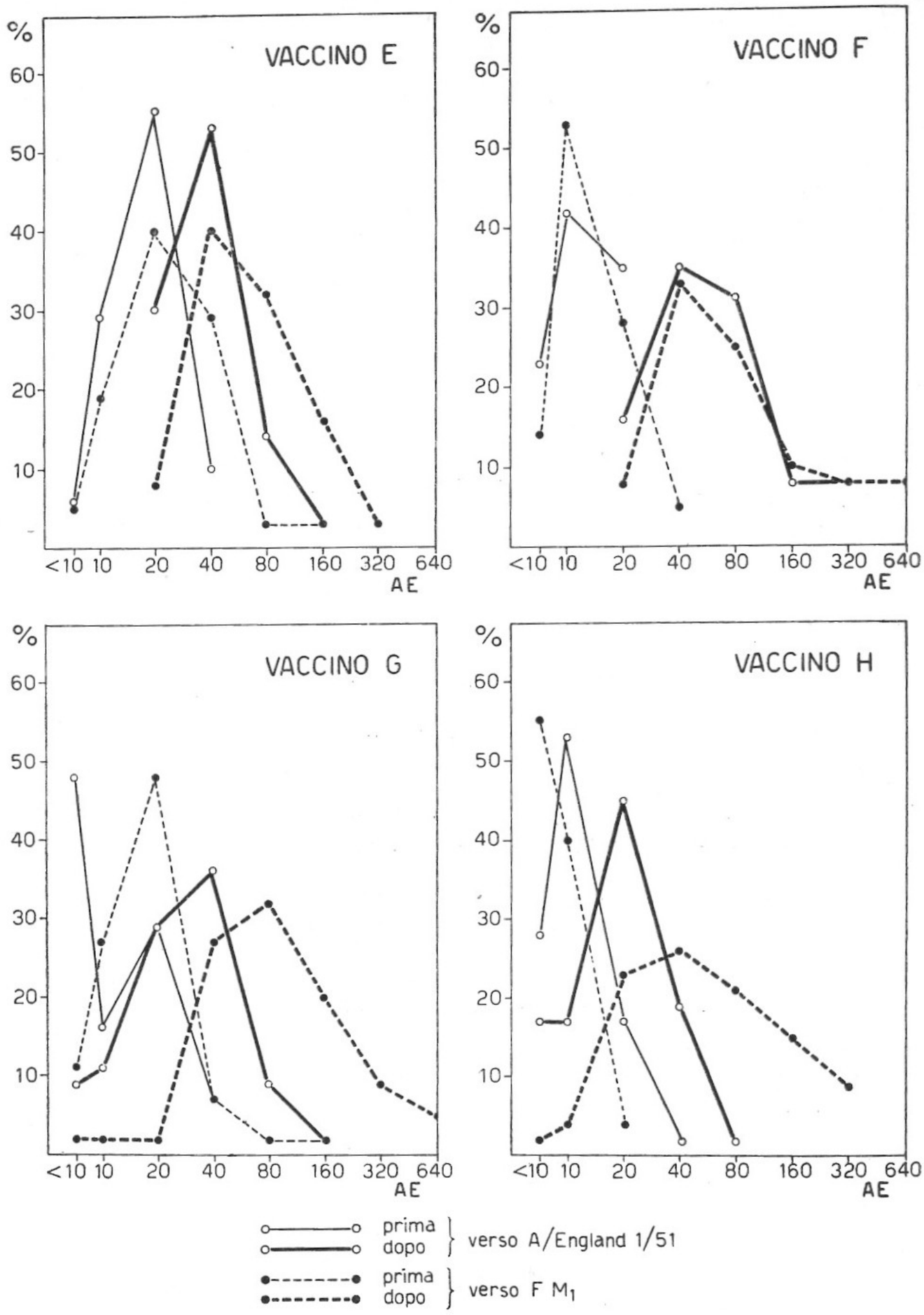

Fig. 1. - Distribuzione della frequenza dei titoli di antiemoagglutinine in adulti prima e due settimane dopo l'inoculazione di 1 cc. di vaccino.
I vaccini E ed F sono stati preparati partendo dal ceppo A/England/1/51; G ed H dal ceppo FM1. I vaccini F ed H sono tre volte più concentrati dei rispettivi originali E e G.
Nelle ascisse è espresso il titolo delle antiemoagglutinine (AE) come il valore reciproco della diluizione iniziale del siero al titolo limite di inibizione.

Si preparano diluizioni seriali di ragione due di siero inattivato, usando come diluente brodo comune addizionato del 10% di siero normale di cavallo, pure inattivato. A 0,5 cc di ogni diluizione di siero vengono aggiunti 0,5 cc di liquido allantoideo infetto, diluito nello stesso brodo come sopra, in modo da contenere circa 400 ID_{50} (dose infettante 50, capace cioè di infettare il 50% delle uova inoculate) di virus in 0,2 cc di inoculum. La miscela va tenuta a temperatura ambiente per 10' e ogni miscela viene inoculata in un gruppo di tre uova di pollo incubate da 10 giorni. Il liquido allantoideo di ogni uovo è raccolto dopo 48 ore di incubatrice a 35° e saggiato per la presenza del virus mediante la prova della emoagglutinazione.

Le diluizioni limite del siero, capaci di neutralizzare il 50% delle uova infettate, vennero calcolate applicando il metodo di L. J. Reed e H. A. Münch (3).

Nella Tab. II e nella Fig. 2 sono raccolti i risultati ottenuti con il

Tabella II.

Aumento medio degli anticorpi neutralizzanti nei soldati vaccinati.

Vaccino	Numero dei sieri esaminati	Ceppo (+)					
		A/England/1/51			FM1		
		I° siero	II° siero (++)	Aumento volte	I° siero	II° siero (++)	Aumento volte
E	45	5,3	54	10,2	—	—	—
F	30	8,0	177	22,2	—	—	—
G	41	—	—	—	8,4	126	15
H	20	—	—	—	8,0	104	13

(*) Vennero usate circa 400 ID_{50} uovo.
(**) Prelevato 14 giorni dopo la vaccinazione.

test di neutralizzazione, usando il virus omologo. Il numero delle prove fatte è sufficientemente alto perchè i valori abbiano un significato.

Come appare evidente dalla Fig. 2, la risposta individuale all'azione del vaccino, stabilita con la prova *in ovo*, varia entro limiti piuttosto ampi; però i dati ottenuti sono tali da dimostrare sempre una notevole differenza fra gli anticorpi inibenti e quelli neutralizzanti. Questa diffe-

(3) Am. J. Hyg. 27, 493 (1938).

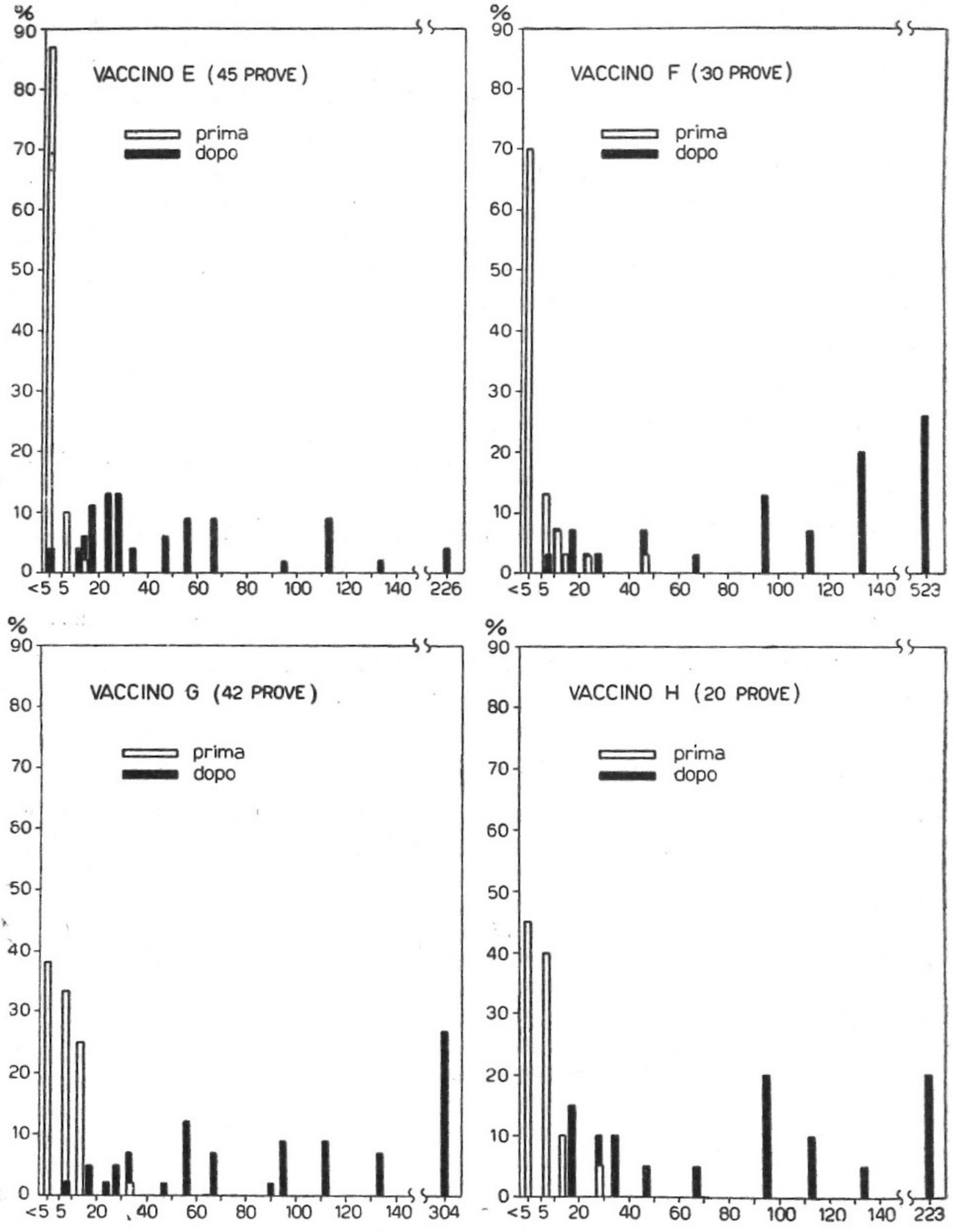

Fig. 2. - Distribuzione della frequenza dei titoli di anticorpi neutralizzanti in adulti prima e due settimane dopo la inoculazione di 1 cc. di vaccino.
I vaccini E ed F sono stati preparati partendo dal ceppo A/England/1/51; G ed H dal ceppo FM1. I vaccini F ed H sono tre volte più concentrati dei rispettivi originali E e G.
Nelle ascisse è espresso il titolo degli anticorpi neutralizzanti, come il valore reciproco della diluizione limite neutralizzante.

renza appare ancora più chiara se si confrontano tra di loro i valori medi degli aumenti, come appare nella Tab. III, dove sono raccolti i risultati corrispondenti per le antiemagglutinine e per gli anticorpi neutralizzanti, determinati nello stesso gruppo di sieri.

La interpretazione più semplice di così notevole differenza, già osservata da altri AA ([2, 4, 5]), sarebbe che l'inibitore aspecifico presente nel siero nasconda, in parte almeno, l'aumento degli anticorpi inibenti.

TABELLA 3.

Tavola comparativa dei valori degli anticorpi inibenti l'emoagglutinazione e di quelli neutralizzanti.

Vaccino	Numero dei sieri esaminati	Ceppo			
		A England/1/51		FM1	
		Aumento-volte		Aumento-volte	
		A I	A N	A I	A N
E	45	2,2	10,2	—	—
F	30	5,8	22,2	—	—
G	41	—	—	5,7	15
H	20	—	—	7,2	13

Nota: A I= anticorpi inibenti l'emoagglutinazione.
A N=anticorpi neutralizzanti.

Questa ipotesi non sembra sufficiente, tanto più se si tiene presente che in molti dei campioni di siero prelevato prima della vaccinazione non fu possibile raggiungere, specialmente usando il ceppo A/England/1/51, il valore della diluizione limite neutralizzante, che in tutti questi casi dovrebbe essere quindi inferiore a 1:5. Si comprende perciò come l'aumento in anticorpi sarebbe stato così anche maggiore di quello ottenuto.

Pare invece più accettabile il concetto già espresso ([2, 4, 5]) che gli anticorpi che noi misuriamo con le tecniche *in vitro* non sono identici a quelli che noi misuriamo mediante quelle *in vivo*: i risultati di questo esperimento proverebbero una volta di più la validità di tale ipotesi.

L'esame dei valori ottenuti con le prove di neutralizzazione conferma in linea di massima le constatazioni fatte in base a quelle di inibizione dell'emoagglutinazione nei confronti del ceppo omologo e cioè che

---

([4]) BURNET F. M. e BEVERIDGE W. I. B. - Austr. J. exp. Biol. *21*, 71, 1943.
([5]) STUART-HARRIS C. H. e MILLER M. H. - Brit. J. exp. Path. *28*, 394, 1947.

mentre il vaccino F più concentrato di quello E dà valori notevolmente più elevati, il vaccino H, pure tre volte più concentrato di quello G, non determina alcuna risposta più intensa (anzi per quanto riguarda gli anticorpi neutralizzanti, vi è una leggera differenza in meno).

Non appare invece molto chiaro dall'analisi dei dati ottenuti con entrambi i metodi quale dei due ceppi abbia un migliore potere antigene. Autori precedenti ([6, 7, 8]) hanno messo in evidenza come ceppi isolati da molto tempo siano in generale migliori antigeni dei ceppi isolati di recente, caratteristica che Isaacs e Sampaio ([8]) attribuiscono al fatto che i ceppi più antichi sono stati per lo più adattati al topo e successivamente passati *in ovo*.

In questo esperimento non si nota una diversità evidente fra il potere antigene di FM_1, ceppo isolato nel 1947 *in ovo* e che poi subì alcuni passaggi in topo per venire poi successivamente ripassato in uovo, e quello di A/England/1/51 isolato e passato sempre in uovo.

I risultati ottenuti con i vaccini originali E e G fanno propendere per questa interpretazione: infatti FM_1 si rivela come un migliore antigene del più recente A/England/1/51. Invece i valori che si hanno con i corrispondenti vaccini più concentrati non sono ugualmente evidenti e perciò lasciano un dubbio sull'interpretazione esatta di essi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

([6]) Salk J. E., Laurent A. M. e McGinnis R. C. - Fed. Proc. *8*, 410 (1949).
([7]) Meiklejohn G., Weiss D. L., Shragg R. I. e Lennette E. H. - Amer. J. Hyg. 55, 1 (1952)
([8]) Isaacs A. e Sampaio A. A. de C. - J. Path. Bact. *65*, 613 (1953).