

## 59. IMMUNIZZAZIONE CONTRO LA MALARIA.

1. — Che esista una immunità contro la malaria è provato per i fatti seguenti:

a) In regioni tropicali, dove senza profilassi, ogni straniero si ammala di malaria, vivono gli indigeni adulti senza mostrare segni di malaria; in questi si osservano accessi di febbre passeggeri, a lunghi intervalli, spesso non avvertiti. Siccome gli adulti sono esposti alle punture di zanzare infette in ogni stagione si deve concludere che questi uomini di colore siano immuni, vivano in uno stato di equilibrio coi parassiti, d'« infezione labile », di « premunizione » (R. Koch, C. Schilling, Schuffner e Swellengrebel, Ed. Sergent, Cuboni e Milani).

Anche in Europa, per es. in Romania una parte della popolazione ha acquistato una resistenza contro la malaria. Ciuca <sup>(1)</sup> inoculò 1198 pazienti con sangue virulento (terzana); 610 (il 50,8 %) non svilupparono nè febbre nè parassitemia; 189 (il 15 %) mostrarono plasmodi nel sangue, ma non febbre, 399 (il 34,2 %) non furono refrattari.

b) Dopo la scoperta di Wagner-Jauregg si può studiare il problema dell'immunità malarica sperimentalmente.

La prima osservazione di immunità contro la terzana prodotta per inoculazione di sangue fu fatta da I. G. Nicole e F. P. Steel <sup>(2)</sup>: 3 malati trattati con chinina dopo un attacco <sup>(3)</sup> non s'infettavano più successivamente con inoculazioni ripetute di sangue virulento. Questi ammalati si mostrarono poi sensibili ad inoculazioni di un altro ceppo di terzana a mezzo di punture di zanzare infette. James <sup>(4)</sup> inoculò di nuovo una ammalata poco tempo (38 giorni) dopo un'attacco troncato con chinina: la seconda infezione era seguita da successo ma il tempo d'incubazione era un poco prolungato (17 giorni).

In un'altra pubblicazione del 1931 James <sup>(5)</sup> dice che è sempre possibile di reinfettare un ammalato entro 24 settimane dopo la guarigione di un primo attacco e che una assoluta resistenza contro reinfezioni è solamente raggiunta dopo una « ricorrenza » (« recurrence ») recidiva



dopo 6 mesi). Ma Cuboni e Milani <sup>(6)</sup> in un rapporto su 28 reinoculazione descrivono il caso di un ammalato resistente contro un'inoculazione 31 giorni dopo un attacco di 5 accessi guarito spontaneamente.

Ciuca e collaboratori <sup>(1)</sup> inocularono 204 persone che dopo una prima iniezione di sangue avevano reagito o con febbre e parassitemia o con parassitemia solo, una seconda volta con sangue: 148 rimasero indenni (72,5 %). Mosna <sup>(7)</sup> potè reinfettare 2 soli di 5 ammalati che avevano subito un attacco due anni innanzi. Boyd, Stratman-Thomas e Kitchen <sup>(7<sup>a</sup>)</sup> ritengono che l'immunità dopo un attacco di terzana duri almeno tre anni.

Se esista ancora un'immunità sterile dopo la guarigione spontanea di un attacco, è ancora questione problematica, perchè anche la trasfusione di una grande quantità di sangue, se negativa, non prova che non vivano parassiti negli organi interni. Con questa restrizione gli esperimenti di Ciuca e collab. e di Boyd e collab. sembrano provare l'esistenza di una immunità sterile anche nella malaria.

b) Che il siero del sangue di un malarico contenga anticorpi, per quanto so, fu provato la prima volta dal mio assistente H. Neumann <sup>(8)</sup> nel laboratorio del Prof. Missiroli. Mosna <sup>(9)</sup> potè dimostrare che il siero di *Macacus rhesus* guariti dell'infezione da *Plasmodium knowlesi* conteneva anticorpi parassitocidi.

Contributi di altri autori al problema dell'immunità prodotta sperimentalmente saranno considerati in connesso con la singole parti del lavoro presente.

2. — Gli esperimenti che descrivo nella presente nota sono la conseguenza dei miei lavori sulla tripanosomiasi <sup>(10)</sup>. Nel 1933-35 ho dimostrato che si può iniettare ad un animale sensibile, per es. ad un vitello, fino a 40 tripanosomi (tr. brucei o congolense) senza produrre la malattia mortale. Ripetendo iniezioni di quantità di parassiti « sotto la soglia infettante », si può aumentare la resistenza primitiva tanto che una infezione seguente per mosche tsetse non finisce con la morte dell'animale ma con una infezione latente o « premunizione » ed immunità contro superinfezioni <sup>(11)</sup>.



## I. Metodi

Ho lavorato sempre e solo col ceppo « Madagascar » di *P. vivax* che James da Horton (Inghilterra) ha mandato all'Istituto di Sanità Pubblica a Roma.

*Presa del sangue.* — Preferisco mescolare il sangue d'un malato non con soluzione fisiologica (NaCl 0,8 %) ma con la soluzione Ringer plus 2 % di citrato di sodio; ho osservato che i trapanosomi sono stati danneggiati molto dalla soluzione fisiologica.

*Conteggi degli schizonti.* — Immetto un ago di 1,0-1,5 mm. di calibro in una vena per es. del piega gomito. Quando fluiscono gocce continuamente prendo il sangue con un capillare sterile lungo almeno 40 cm. e d'un calibro di 1 mm. Si misura la colonna del sangue lungo una riga divisa in millimetri. Su un portaoggetto ben terso da tracce di grasso si mette una goccia spessa di sangue; si misura di nuovo il resto nel capillare e si soffia il resto in una scatolina di vetro contenente 1 cc. di soluzione Ringer plus 2 % di citrato di sodio sterile e si mescola bene. Frattanto un assistente stende la goccia con un ago sterile su un quadrato di 18 mm. di lato; si fa poscia seccare e si colora il preparato colla tecnica conosciuta delle gocce spesse.

Prima con l'obbiettivo micrometrico si misura il diametro di un campo microscopico con immersione (e per contare gli sporozoiti, con un obbiettivo a secco) e con un oculare idoneo. Si contano i parassiti in 100 campi della goccia spessa colorata, e per calcolo semplice si trova il numero dei parassiti in tutta la goccia spessa ed anche nel resto della colonna di sangue diluito prima in 1 cc. di soluzione Ringer. Il metodo non dà cifre assolutamente esatte, ma abbastanza precise.

*Conteggio degli sporozoiti.* — Il metodo d'allevamento delle zanzare è quello in uso nel laboratorio del Dr. Mosna e da me descritto in un articolo (Archiv. f. Schiffs - Trop.hyg. vol. 43, pag. 194, 1939).

Le zanzare che hanno preso il sangue di un portatore di gametociti 12 e più giorni prima, sono catturate con una provetta nel numero desiderato dalla gabbia. Si stordisce e si uccide le zanzare scuotendo fortemente la provetta, si strappa gambe ed ali, si fissa su di un porta-oggetti il corpo giacente sul suo lato sinistro con un ago messo nei muscoli del



dorso, si taglia la testa al collo, si mette il corpo in una goccia di Ringer sterile e con un secondo ago si comprime la parte prossimale (anteriore) e ventrale del torace fino che esce un poco del contenuto della parte prossimale del torace, che viene strappato dal resto, contentente anche le ghiandole.

La goccia è poscia coperta con un copri-oggetto grande  $24 \times 30$  mm.; così la ghiandola viene quasi sempre rotta tanto che ne escono sporozoiti, bastanti per determinare l'infezione. Se il reperto è positivo, si prende il margine del copri-oggetto con una pinza a punte piatte e si trita il materiale con movimenti orizzontali del copri-oggetto sul porta-oggetto. Ogni tanto si esamina il preparato per vedere se le ghiandole, spesso molto tenaci, sono distrutte tanto che si trovi solo i condotti privi di cellule. Gli sporozoiti si distribuiscono ben regolarmente nel liquido. Dopo avere triturato del tutto le ghiandole, si toglie il copri-oggetto e si aspira l'emulsione delle ghiandole in un capillare di 1 mm. di ampiezza. Si misura la colonna del liquido con la riga, si depone una piccola goccia sopra un porta-oggetto, si copre la goccia con un copri-oggetto quadrato con lato di 18 mm. e si chiude il margine con cera, usando il lucignolo di una candeletta a pennello. Si contano gli sporozoiti con un obbiettivo a secco forte. Il resto del liquido nel capillare è misurato e soffiato in 1 cc. di soluzione Ringer.

Non riesce facile mettere a fuoco lo strato che contiene gli sporozoiti; piccolissimi granuli e altri residui delle cellule distrutte aiutano la messa a fuoco. Poichè si è misurato il diametro del campo microscopico, e si è contato il numero degli sporozoiti in cento campi, si può calcolare il numero dei campi in  $18 \times 18$  mm. (area del copri-oggetto), gli sporozoiti contenuti in questi 324 mmq., cioè nella goccia e così nel resto del liquido diluito in 1 cc. La goccia deve essere fatta tanto grande, che riempia il piano sotto il copri-oggetto, ma non esca oltre il margine. L'incorniciare con cera è necessario per evitare il seccare della goccia.

Soffiando l'emulsione dal capillare si evita che gli sporozoiti si fissino alle pareti del capillare.

Il metodo rassomiglia a quello di Shute <sup>(12)</sup>, ma mi sembra più semplice e nondimeno abbastanza esatto. Ciononostante davanti a tutti i numeri delle tavole seguenti si dovrebbe mettere un « circa... ».



Per provare l'infettività di zanzare che hanno punto un uomo, si uccidono le zanzare e si esaminano le ghiandole salivari. Il reperto di cisti sullo stomaco non è prova dell'infezione delle ghiandole.

*Iniezioni endovenose.* — Si introduce un ago in una vena della piega del gomito; quando il sangue fuoriesce bene, si innesta la siringa contenente il liquido, che viene iniettato evitando bolle d'aria. Dopo l'iniezione si ritira il pistone 2-3 volte e si lava la siringa col sangue. Poi si prende via la siringa, si lascia l'ago ancora per qualche secondo nella vena, e si ritira rapidamente. Così si evita un'iniezione di sporozoiti accanto alla vena.

II. — I miei saggi d'immunizzare contro la malaria miravano ad un doppio fine: una vaccinazione preventiva senza produrre febbre, che aiuti l'organismo a sopprimere lo sviluppo della prima infezione, durante l'infanzia; ed una vaccinazione che aiuti l'organismo già infetto a sviluppare una immunità dopo l'attacco. Per questi processi l'osservazione della popolazione delle regioni iperendemiche, specialmente nei paesi tropicali, fornisce un modello molto istruttivo.

I dettagli dello sviluppo dell'immunità nell'organismo di un neonato non sono bene conosciuti; nessun medico ha osservato questo processo passo a passo, perchè il medico è obbligato a curare il neonato. Ma dopo tante osservazioni particolari si può comporre un mosaico abbastanza esatto.

In questo processo agiscono due tipi d'antigeni, gli schizonti durante gli accessi, e gli sporozoiti inoculati con punture d'anofeli (<sup>13</sup>).

#### **Vaccinazione per mezzo degli schizonti.**

L'azione dell'antigene degli schizonti sopravviene con ogni accesso [Neumann (<sup>8</sup>)], e per la quantità e la frequenza dell'azione codesto antigene è certamente molto attivo. Perciò ho provato prima se si può immunizzare un uomo contro questo antigene.

Le iniezioni sono state fatte sempre sotto la cute.



TAVOLA I.

PERSONE TRATTATE CON SCHIZONTI.

| N. della persona             | Prima iniez. Num. degli schizonti | 2    | 3     | 4       | 5       | 6     | 7     | 8     | 9     | Durata della vaccinazione mesi |
|------------------------------|-----------------------------------|------|-------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| a) Senza produrre infezione. |                                   |      |       |         |         |       |       |       |       |                                |
| 12                           | 100                               | 500  | 1000  | 2000    | 4000(*) |       |       |       |       | 3                              |
| 13                           | 200                               | 500  | 1000  | 2000(*) |         |       |       |       |       | 3                              |
| 2                            | 100                               | 100  | 200   | 500     | 1000    | 2000  | 4000  | 8000  | 16000 | 5                              |
| 29                           | 500                               | 1000 | 3000  | 9000    | 27600   |       |       |       |       | 2                              |
| 30                           | 500                               | 1000 | 3000  | 9000    | 27600   |       |       |       |       | 2                              |
| 27                           | 500                               | 1000 | 2000  | 4000    | 8000    | 16000 | 30000 | 30000 | 30000 | 6                              |
| 28                           | 500                               | 1000 | 2000  | 4000    | 8000    | 16000 | 30000 | 30000 |       | 4                              |
| 32                           | 500                               | 2000 | 8000  | 32000   |         |       |       |       |       | 1 1/2                          |
| 45                           | 750                               | 3000 | 12000 | 50000   |         |       |       |       |       | 2 1/2                          |
| 46                           | 1000                              | 4000 | 16000 | 60000   |         |       |       |       |       | 2 1/2                          |
| 47                           | 1250                              | 5000 | 20000 | 80000   |         |       |       |       |       | 2 1/2                          |
| b) Persone infette.          |                                   |      |       |         |         |       |       |       |       |                                |
| 31                           | 500                               | 2000 | 8000  | 32000   |         |       |       |       |       | 1 1/2                          |
| 49                           | 1000(*)                           |      |       |         |         |       |       |       |       |                                |

(\*) Iniezioni interrotte.

Dalla tavola I si può concludere:

a) che l'uomo possiede una resistenza fondamentale contro l'infezione sottocutanea di schizonti di terzana. Di 13 persone una sola (49) fu infettata con la prima iniezione di circa 1000 schizonti. Un'altra (46) non fu infettata con la stessa dose; il N. 47 fu infettato con circa 1250 schizonti;

b) che non esiste una fase negativa dopo la prima o seconda iniezione;

c) che gli schizonti contengono (producono?) un antigene attivo, che stimola fortemente le forze di resistenza dell'organismo umano. Perciò si può progredire presto per es. in 42 giorni (N. 32) ad un alto grado, aumentando le dosi 1:4;



d) che aumentando le dosi 1:4 e ripetendo le iniezioni troppo presto per es. entro 9 giorni (31), può intercorrere una infezione. Questo tuttavia si è manifestato una volta su 9 casi simili;

e) *che si può immunizzare uomini contro alte dosi di schizonti della terzana senza produrre febbre.*

Non ho conosciuto nella letteratura nessun esempio di tale vaccinazione senza produrre febbre e parassitemia.

Gli schizonti dunque contengono un antigene attivo; se questo antigene stimoli l'organismo alla produzione d'anticorpi, finora non potei esaminare.

Neanche ho esaminato se gli schizonti iniettati sono distrutti, o se vivono senza apparire nel sangue periferico, in altri termini: se c'è una infezione labile (premunizione), o se è un'immunità sterile.

Il reperto della possibilità di fare agire l'antigene malarico nel corpo umano, di produrre una reazione immunitaria senza produrre febbre, apre una prospettiva per la *malarioterapia della paralisi progressiva*. I dieci e più accessi di una cura antiparalitica danneggiano e indeboliscono l'ammalato; in ammalati stremati la cura non può essere eseguita. Una cura non debilitante sarebbe un grande vantaggio nella terapia delle psicosi. Mi credo giustificato di raccomandare la prova di questo metodo in casi recenti, progredienti lentamente, alle cliniche di psichiatria. Sarebbe da provare se un'immunizzazione rapida (esempio N. 45) forse con iniezioni frequenti della dose massima, o un progredire lentamente, a lunga distanza (esempio N. 3) sia più attivo.

Come si potrà usare questo fatto di un'immunità dopo iniezioni di schizonti come base d'altri metodi, esporrò più tardi (pag. 910, Tavola III).

2) Era naturale provare se persone con immunità contro alti numeri di schizonti siano anche immuni contro sporozoiti. Per tale prova si può o iniettare sporozoiti sotto la cute o fare pungere le persone da anofeli infetti.

a) Usando per l'infezione sporozoiti isolati dalle ghiandole salivari, bisognerebbe fissare la dose minima certamente infettante.



TAVOLA II.

INIEZIONI DI SPOROZOITI.

| N. della persona               | Prima iniez. numero sporozoiti | 2    | 3    | 4    | 5                               | 6    | 7    | 8    | 9    | 10       |
|--------------------------------|--------------------------------|------|------|------|---------------------------------|------|------|------|------|----------|
| 1. - Senza produrre infezioni. |                                |      |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 23                             | 50                             | 100  | 200  | 400  | 400                             | 800  | 1000 | 1000 | 1000 | 4950 (*) |
| 63                             | 100                            | 100  | 100  | 200  | punto da zanzare, non infettato |      |      |      |      |          |
| 66                             | 100                            | 100  | 100  | 200  | » » » »                         |      |      |      |      |          |
| 65                             | 100                            | 100  | 100  | 200  | 200                             | (*)  |      |      |      |          |
| 62                             | 100                            | 100  | 200  | 200  | punto da zanzare, infettato     |      |      |      |      |          |
| 61                             | 100                            | 100  | 200  | 200  | » » »                           |      |      |      |      |          |
| 60                             | 100                            | 100  | 200  | 200  | 300                             | (*)  |      |      |      |          |
| 59                             | 100                            | 100  | 200  | 200  | 300                             | (*)  |      |      |      |          |
| 57                             | 100                            | 200  | 400  | 800  | 1000                            | (*)  |      |      |      |          |
| 39                             | 600                            |      |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 50                             | 1000                           | 1000 | 1000 | 1000 | punto da zanzare, infettato     |      |      |      |      |          |
| 2. - Seguiti d'infezioni.      |                                |      |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 21                             | 50                             | 100  | 200  |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 22                             | 50                             | 100  | 200  |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 67                             | 100                            | 100  | 100  | 200  |                                 |      |      |      |      |          |
| 24                             | 100                            | 200  | 400  |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 25                             | 100                            | 200  | 400  | 400  |                                 |      |      |      |      |          |
| 26                             | 100                            | 200  | 400  | 400  | 600                             | 800  | 1000 | 1000 | 1000 | 1500     |
| 8                              | 200                            | 400  | 400  |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 9                              | 400                            | 500  | 500  |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 17                             | 500                            | 500  |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 18                             | 500                            | 500  |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 38                             | 600                            | 800  |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 10                             | 800                            | 1500 |      |      |                                 |      |      |      |      |          |
| 53                             | 1000                           | 1000 | 1000 | 1000 | 1000                            | 1000 | (*)  |      |      |          |
| 52                             | 1000                           | 1000 | 1000 | 1000 | 1000                            | 1000 | (*)  |      |      |          |
| 51                             | 1000                           | 1000 | 1000 | 1000 | 2000                            | 2000 | 2000 |      |      |          |
| 11                             | 1600                           | 3000 |      |      |                                 |      |      |      |      |          |

(\*) Le iniezioni saranno continuate.

La tavola II dimostra:

a) che non sono mai riuscito ad infettare un uomo per mezzo della prima iniezione, con dose da 50 fino a 1600 sporozoiti. Anche contro gli sporozoiti l'organismo umano possiede una resistenza basale distinta;

b) che dal materiale non risulta una dose minima infettante. Differenze individuali sono d'una importanza considerevole (vedi parte V-b).

(L'ammalato N. 26 era un caso eccezionale, depresso e debole che rifiutava spesso la nutrizione; la sua reattività era sicuramente abbassata);



c) le dosi di sporozoiti iniettate sono piccole come quantità, ma anche la loro potenza antigena sembra essere debole.

De Sanctis-Monaldi (<sup>14</sup>) con dosi molto più alte (5000-90000) poteva infettare un solo ammalato su tre per via sottocutanea. I suoi esperimenti furono eseguiti in gennaio! (vedi pag. 913).

Persone che resistono alte dosi di schizonti, sono immuni contro alte dosi di sporozoiti?

Il modo di prova più sicuro è di esporre tali persone alle punture di zanzare infette.

Questo esperimento fu fatto con i pazienti N. 27 (dopo 9 iniezioni di schizonti fino a 30000), N.ri 45, 46 e 47 (dopo 4 iniezioni fino a 50000, 60000 e 80000). Tutte queste persone s'infettarono. *Contro un numero altissimo* — certamente molte migliaia — *di sporozoiti* contenuti nella saliva degli anofeli *l'immunità contro schizonti non protegge*.

L'unico segno di una resistenza fu che nei N.ri 46 e 47 (ma non nel N. 45) i parassiti apparirono 4 e 5 giorni prima della febbre. Il decorso delle infezioni fu del tutto regolare.

Boyd e collab. (1936) discutono la questione fatta sulla base di un caso.

Il fatto che l'immunità antischizontica non protegga contro sporozoiti, non solo è importante dal punto di vista pratico, ma è molto interessante come reperto biologico. Gli schizonti sono forme asessuali, adattati alla vita parassitaria nel sangue dell'uomo; hanno un metabolismo tutto speciale, come è documentato fra l'altro per la formazione di due pigmenti nel corpo dei plasmodi. Al contrario gli sporozoiti sono il prodotto di un processo sessuale, sono adatti ad una famiglia di zanzare, vivono alla fine del loro sviluppo nella saliva delle ghiandole. Si può ben capire che il « Generationswechsel » tanto caratteristico si manifesti anche in un aumento del potere degli antigeni. Sarebbe interessante indagare se un tale cambiamento capitò nel ciclo di sviluppo di altri plasmodi, per es. degli uccelli.

III. — Allo sviluppo dell'immunità degli indigeni delle zone iperendemiche partecipa non solo l'antigene degli schizonti (antigene degli accessi) ma agli indigeni sono inoculati continuamente in tutte le stagioni



sporozoiti. Questi con la saliva velenosa, introducono anche sostanze specifiche, probabilmente antigeni.

a) Che sia così, si può dedurre dalla comparazione degli esperimenti N.ri 27, 45, 46 e 47 (vedi parte II-b) da una parte, e dall'esperimento N. 3 dall'altra. I N.ri 29 e 32 sono esperimenti paralleli al 30.

TAVOLA III.

VACCINAZIONE CON SCHIZONTI; INIEZIONI DI SPOROZOITI CONTATI.  
PUNTURE DI ZANZARE INFETTE.

| N. delle persone | Vaccinazione contro schizonti | Giorni tra fine della vaccinazione con schizonti e inizio delle iniezioni di sporozoiti | Sporozoiti iniettati                 | Giorni tra fine delle iniezioni di sporozoiti e punture delle zanzare | Risultati                     |
|------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 30               | Vedi Tavola I                 | 20 giorni                                                                               | 500, 500, 500, 1000                  | 16 giorni                                                             | Non infettato                 |
| 32               | »                             | 12 giorni                                                                               | 500, 500                             | 26 giorni                                                             | Infettato<br>Incub. 15 giorni |
| 29               | »                             | 20 giorni                                                                               | 500, 500, 500, 1000, 1200, infettato |                                                                       |                               |

I primi (27, 45, 46 e 27 Tavola II) mostrano che l'immunità contro alte dosi di schizonti non protegge contro l'infezione per sporozoiti.

Al contrario il N. 30 dopo la vaccinazione con schizonti e dopo avere ricevuto 4 iniezioni di sporozoiti si mostra resistente contro l'infezione per punture di zanzare per quattro mesi. Io considero questo come una prova che le quattro iniezioni di sporozoiti, dopo la vaccinazione con schizonti, sono bastate in questo caso a proteggere la persona contro la prova più rigorosa, la puntura di 5 zanzare.

I 2500 sporozoiti hanno avuto *l'effetto di un antigene ed immunizzato la persona*, senza produrre nè febbre, nè parassitemia in tutto il corso della vaccinazione.

Al contrario il N. 32 dopo 12 giorni avendo ricevuto prima una, poi una seconda iniezione di 500 sporozoiti, fu infettato. Forse i 1000 sporozoiti in questo individuo non bastarono.



Il N. 29 dimostra, come per i casi 64, 25, 26 ecc. della tavola II, che la resistenza dopo iniezioni di sporozoiti può restare debole e individualmente minore.

b) Lo stesso è dimostrato dagli esperimenti, in cui ho iniettato *sporozoiti soli*.

A) Nella tavola II, parte 1<sup>a</sup> le persone N.ri 65, 60, 59 e 57 sono ancora in trattamento progressivo. Finora questi individui non si sono infettati e non hanno avuto febbre malarica. Si vede che progredendo lentamente (10-25 giorni di distanza dalle iniezioni) e aumentando cautamente le dosi si può arrivare a dosi di 1000, anche 2000 sporozoiti (51). Ma malgrado la più grande cautela accade che la stessa dose fa scoppiare l'infezione.

Non posso trovare una ragione per tale comportamento strano. Nei casi 25, 8, 9, 17 e 18 gli intervalli fra la dose non infettante e l'infettante erano un poco lunghi (25-39 giorni), ma nei casi 51, 32 e 53 erano di 18, 20 e 20 giorni. Il fattore « tempo » non sembra essere importante. Neanche è decisiva l'« età » degli sporozoiti, e il tempo da quando i parassiti sono entrati nelle ghiandole salivari, per es. nel N. 51 (tavola II) l'« età » degli sporozoiti iniettati il 25 febbraio, il 17 marzo ed il 5 aprile era 10, 14 e 10 giorni; l'ultima iniezione di 2000 sporozoiti infettava, le due precedenti no.

B) *L'azione immunizzante dell'antigene degli sporozoiti è incerta.*  
— 9 iniezioni fatte al N. 23, in tutto 4950 sporozoiti, distribuiti per 6½ mesi senza produrre febbre nè parassitemia, non bastò a proteggere assolutamente l'ammalato contro l'infezione di 5 zanzare; dopo un incubazione molto prolungata (91 giorni; media 16,5 giorni) si sviluppò una terzana doppia, in principio con pochissimi plasmodi.

Nondimeno considero questo caso come una prova che gli sporozoiti iniettati sotto la cute agiscono da antigene: è il solo caso con una incubazione tanto prolungata. Tutti i casi nei quali una infezione era probabile, s'ammalarono entro 14 e 22 giorni. Lo stesso ceppo negli esperimenti di Mosna non ha mai prodotto infezioni con incubazione tanto prolungata. Mai nell'Ospedale di S. Maria della Pietà di Roma si è osservato periodi d'incubazione da 6 a 8 mesi, come Korteweg ha osservato per la prima volta.



Ci sono ancora altre prove:

I pazienti 63 e 66 dopo 4 iniezioni distribuite in 2 mesi hanno resistito finora all'infezione per punture di zanzare. Il tempo (5 settimane) è ancora troppo corto; ma almeno si può già dire che la resistenza di questi due individui è aumentata.

A questi risultati positivi contrastano le osservazioni N. 61, 62 e 50 dopo quattro iniezioni di sporozoiti e infezioni per mezzo di zanzare. Non posso spiegare questa differenza.

C) In natura l'inoculazione della malaria ha luogo nella cute e nel tessuto sottocutaneo. Nell'attimo che la punta dell'ipofaringe della zanzara entra in un capillare di sangue, la corrente della saliva contenente gli sporozoiti si ferma e torna indietro mentre il sangue entra. Se mai sporozoiti escono nel sangue, può avvenire in minima quantità soltanto.

Ho pensato che forse l'iniezione di una quantità considerevole di sporozoiti iniettati direttamente nel sangue potrebbe causare reazioni specifiche differenti.

TAVOLA IV.

INIEZIONI ENDOVENOSE.

|    |                       |                         | 1-5-39<br>2500 spor. | 20-5-39<br>8000 spor. |
|----|-----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| 67 | 21-3-39<br>100 spor.  | 1-5-39<br>500 spor.     |                      |                       |
| 68 | 11-5-39<br>500 spor.  | 15-6-39<br>2500 spor.   |                      |                       |
| 69 | 11-5-39<br>1000 spor. | 15-6-39<br>5000 spor.   |                      |                       |
| 70 | 15-5-30<br>1000 spor. | 15-6-39<br>10.000 spor. |                      |                       |

Il paziente N. 67 ha ricevuto in due mesi 11.100 sporozoiti nelle vene; nessun sintomo di malaria seguiva, il sangue era sempre libero da plasmodi; in maggio si sviluppò una nefrite con febbre irregolare e emorragia (8.6.39) che mi costrinse ad interrompere le iniezioni.

Gli ammalati 68, 69 e 70 non sono abbastanza progrediti nella vaccinazione, ma si può già dire che con questo metodo si può introdurre un numero di sporozoiti che, iniettate sotto la cute, probabilmente avrebbe prodotto l'infezione.



Le iniezioni a 68, 69 e 70 saranno continuate.

De Sanctis-Monaldi (loco cit.) ha iniettato tra 2500-100000 sporozoiti nelle vene di 7 persone; con dosi di 2500, 50000 e 100000 ha prodotto infezioni, non con dosi di 5000, 30000, 75000 e 90000. Si può comparare appena i suoi esperimenti con i miei.

IV. — Il processo d'immunizzazione degli indigeni delle zone malariche iperendemiche comincia poco dopo la nascita ed è sempre inaugurato da un attacco febbrile e da una invasione di plasmodi; seguono superinfezioni ed una serie d'attacchi che finiscono o con la morte del neonato o, dopo una lunga lotta tra il parassita ed il corpo, con la premunizione e la non suscettibilità a superinfezioni.

In esperimenti sull'uomo non si può lasciare sviluppare questo processo. Ma dopo le osservazioni degli autori citati si deve supporre che già un solo attacco possa dare un certo grado di resistenza all'ammalato. Ho pensato di usare questa resistenza basale secondaria ed aumentarla con iniezioni di sporozoiti.

TAVOLA V.

| N.<br>del paziente                                 | Giorni dopo<br>l'ultima dose<br>di chinina   |                             |                                      |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <i>a) Il primo attacco fu troncato con chinino</i> |                                              |                             |                                      |
| 48                                                 | 72                                           | punto da anofeli<br>infetti | fu infettato (incubazione 19 giorni) |
| 32                                                 | 88                                           | punto da anofeli<br>infetti | fu infettato (incubazione 44 giorni) |
| 31                                                 | 144                                          | punto da anofeli<br>infetti | fu infettato (incub. 20 giorni)      |
| N.<br>del paziente                                 | Giorni dopo<br>l'ultimo giorno<br>con febbre |                             |                                      |
| <i>b) guarito spontaneamente</i>                   |                                              |                             |                                      |
| 32                                                 | 41                                           | punto da anofeli<br>infetti | fu infettato (incub. 16 giorni)      |
| 32b                                                | 45                                           | punto da anofeli<br>infetti | non infettato                        |
| 49                                                 | 77                                           | punto da anofeli<br>infetti | ” ”                                  |



TAVOLA VI.

| N. del paziente                             | Giorni dopo l'ultima dose di chinina  | Sporozoiti iniettati                          |                                                |                          |                            |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| a) Il primo attacco fu troncato con chinina |                                       |                                               |                                                |                          |                            |
| 20                                          | 78                                    | 2000<br>2000<br>3000                          | Infettato                                      |                          |                            |
| 22                                          | 46                                    | 1000<br>2000<br>3000<br>7000<br>Non infettato | 4 giorni dopo l'ultima iniezione di sporozoiti | Punto da anofeli infetti | Parassitemia ma non febbre |
| N. del paziente                             | Giorni dopo l'ultimo giorno di febbre |                                               |                                                |                          |                            |
| a) Guarito spontaneamente                   |                                       |                                               |                                                |                          |                            |
| 25                                          | 18                                    | 800<br>1000<br>1000<br>1000<br>Non infettato  | 17                                             | Punto da anofeli infetti | Non infettato              |

Da queste tavole si può concludere:

a) che la guarigione chemioterapica con chinina, cioè la soppressione della febbre e degli schizonti non favorisce lo sviluppo di un'immunità contro l'infezione violenta con 5 zanzare (N. 48, 32 e 31);

b) che la «guarigione spontanea» (cioè la scomparsa della febbre e dei parassiti dal sangue periferico) dà una resistenza evidente (32-b e 49 non infettati, 32 infettato);

c) che l'inoculazione di sporozoiti dopo la guarigione sembra aumentare la resistenza: mentre il N. 20 fu infettato con gli sporozoiti, come gli ammalati N. 21, 22, ecc. (Tavola II, 2), l'ammalato N. 22, dopo il suo primo attacco troncato con chinina, dopo una serie d'iniezioni di sporozoiti e dopo essere stato punto da anofeli, mostrò un comportamento del tutto irregolare: dopo un'incubazione di 29 giorni (media 16,5 giorni) sono apparsi rarissimi schizonti (nessun gametocito) nel sangue periferico, ma la temperatura è rimasta sempre normale. Non ho mai



visto un caso analogo, ma Mosna (comunicazione personale) ha visto talvolta parassitemie passeggiare senza febbre, e così anche Ciuca. Noi consideriamo tale evento come segno di una reazione immunitaria. Più significativo ancora è il decorso dell'esperimento N. 25: infezione in corso di vaccinazione con sporozoiti, ma, dopo 24 giorni d'incubazione; due accessi soltanto di febbre (massimo 38,5), 5 giorni di parassitemia; ciò nonostante si continuò l'iniezione di sporozoiti; dopo 9 iniezioni in tutto, si applicarono anofeli infetti, senza avere nessuna reazione malarica. L'effetto combinato della guarigione spontanea e della vaccinazione con sporozoiti riuscì ad immunizzare l'individuo completamente.

L'importanza di questi esperimenti dal punto di vista pratico sarà esposta più tardi.

V. — a) Nel decorso della malaria si sono osservati diversi fenomeni immunitari: prolungamento dell'incubazione, accessi abortivi, parassitemia senza febbre, guarigione spontanea dell'attacco, e, finalmente resistenza assoluta contro l'infezione per un numero illimitato di sporozoiti, e contro la puntura di anofeli infetti.

Ho osservato tutti questi fenomeni nelle mie indagini sperimentali. Lo sviluppo di una immunità anche per la malaria indotta è provato di nuovo. Ma il fatto nuovo dimostrato ora è che si può arrivare per via della vaccinazione ad alti gradi d'immunità *senza produrre febbre*.

b) Numerose furono le osservazioni di un'influenza preponderante della reattività individuale. Un buon esempio di reattività debole è l'ammalato N. 26, che s'infettava dopo 10 iniezioni di sporozoiti. Il contrario è il caso N. 30 in cui 4 iniezioni di sporozoiti bastavano per aumentare la sua resistenza fino all'immunità assoluta.

Le persone vaccinate da me erano in stato di salute generale molto differente; il decorso delle inoculazioni ha provato che solo individui in buona salute possono fornire risultati attendibili.

c) Un altro fatto è l'influenza di una *infezione malarica precedente*. Le persone vaccinate da me solo di raro avevano presentato malaria pregressa. A questo riguardo le inoculazioni nei volontari a Berlino (N.ri 8,



9, 10, 11, 17 e 18) furono specialmente caratteristiche: resistenza fondamentale piccola, infezione dopo la seconda o terza iniezione di sporozoiti. Esperimentando in paesi malarici si deve sempre tenere in conto la possibilità o probabilità di una infezione precedente.

d) Sarebbe utilissimo di avere in mano una reazione che indicasse lo stato della resistenza individuale. Tentativi diversi non hanno fornito più accenni di reattività differenziata. La reazione di Henry non mi sembra abbastanza specifica.

e) Il paziente N. 19 nel luglio 1938 fu punto da un solo anofele, e s'infettò. Due simili prove fatte con un anofele certamente infetto in ottobre non riuscirono (N. 40 e 41). In dicembre tre anofeli non bastavano a produrre febbre e parassitemia (caso 41), ma occorsero 5 anofeli. Tale « dose » era certamente infettante. Boyd, Kitchen e Muonch (1936) hanno osservato lo stesso fatto di una diminuzione della virulenza degli sporozoiti inoculati dagli anofeli, durante la stagione fredda.

f) Ho dimostrato già fin dal 1905 che contro i tripanosomi della malattia da tsetse, gli animali giovani resistono meglio che gli animali adulti. In una zona iperendemica un tentativo di proteggere i neonati con iniezioni prima di schizonti, poi di sporozoiti (come l'ammalato N. 30) sarebbe giustificato. In Sardegna p. es. ove fu constatata ufficialmente nel 1935 una mortalità per malaria di 3,83 per 10.000 abitanti, un esperimento potrebbe dare risultati istruttivi.

g) In tutta l'Italia nel 1935 furono segnalati dagli ufficiali sanitari 163.000 casi di malaria; nella sola Sardegna il 6,412 % della popolazione. Queste persone, dopo essere trattate con chinina durante una stagione malarica possono prendere un'altra infezione nell'anno prossimo; come l'inverno interrompe la stagione malarica, anche l'immunizzazione attiva è interrotta. Tali ammalati, come i pazienti N. 22 e 25, con una serie d'iniezioni di sporozoiti, potranno probabilmente essere protetti contro l'infezione della stagione seguente; aggiungendo alla cura con chinina una serie di iniezioni di schizonti si potrà riuscire probabilmente ad aumentare di molto la resistenza dei convalescenti.



## RIASSUNTO

1) L'uomo adulto possiede una resistenza naturale contro un numero minimo di parassiti di *P. vivax* (ceppo Madagascar), tanto contro schizonti quanto contro sporozoiti.

2) Partendo da questa dose di schizonti, inoculata sottocute, non infettante ed aumentando le dosi si può arrivare ad una resistenza molto alta (80.000 schizonti).

3) La sensibilità dell'uomo contro gli sporozoiti iniettati sotto la cute è più grande che contro gli schizonti.

4) Il valore degli sporozoiti come antigene è incerto, ed è molto influenzato dalla reattività individuale.

5) Nondimeno sono riuscito ad aumentare la resistenza in un paziente (N. 23), esclusivamente con la vaccinazione di soli sporozoiti.

6) Una immunità contro la puntura di anofeli infetti fu prodotta con la vaccinazione prima con schizonti, dopo con sporozoiti (N. 30).

7) Dopo un solo attacco guarito spontaneamente si sviluppa una resistenza abbastanza forte che protegge contro l'infezione con anofeli infetti (N. 32 e 49).

8) Questa resistenza può essere aumentata con iniezioni di sporozoiti (N. 22 e 25).

Le indagini saranno continuate in collaborazione col Prof. Missiroli e col Dr. Mosna.

## BIBLIOGRAFIA

(<sup>1</sup>) CIUCA, BALLIF e CHELARESCU, VIERU, Transact. Roy. Soc. trop. med., 27, 619 (1934).

(<sup>2</sup>) « Acquired immunity etc. », Jl. of trop. med., 1, XII (1925).

(<sup>3</sup>) Io nomino « un attacco » la serie di innalzamenti di temperatura; un innalzamento singolo viene chiamato « accesso ».

(<sup>4</sup>) « Epidemiological results etc. », Transac. Roy. Soc. trop. med., 20, 143 (1926-27).

(<sup>5</sup>) « Some general results etc. », Transact. Roy. Soc. trop. med., 24, 477 (1931).

(<sup>6</sup>) « Inoculazione della malaria etc. », Bollett. dell'Ist. Sierot. Milanese, 5, 1 (1931).



- (<sup>7</sup>) « Grado di immunità etc. », Riv. di Malariol., 14, 3 (1935).
- (<sup>7a</sup>) « Duration of acquired immunity », Amer. Jl. trop. med., 16, 311 (1936).
- (<sup>8</sup>) « Nachweis der parasitociden Antikörper etc. », Riv. di Malariol., 12, 3 (1933).
- (<sup>9</sup>) « Contributo allo studio dell'immunità etc. », Riv. di Parass., 2, 327 (1938).
- (<sup>10</sup>) Zeitsch. f. Immunitätsforsch., Vol. 83, 85 e 87 (1935-36).
- (<sup>11</sup>) L'efficacia di questo metodo d'immunizzazione contro la malattia di tsetse fu riconosciuta in una lettera del Direttore del Laboratorio degli studi « Tsetse » in Tanganica dal 1° maggio 1939.
- (<sup>12</sup>) « Technic. of inoculation of sporozoites », Ann. trop. med., 31, 85 (1937).
- (<sup>13</sup>) L'esistenza di uno stadio apigmentato istiotropo nel ciclo di sviluppo dei Plasmodi umani non è abbastanza assicurata per essere già ora considerato dal punto di vista dell'immunizzazione.
- (<sup>14</sup>) « Malaria sperimentale etc. », Riv. di Malariol., 14, 344 (1935).

Vedi, inoltre:

1. ASHFORD, Amer. Jl. trop. med., 16, 665 (1936)..
2. BOYD e collaboratori, Amer. Jl. trop. med., 16 (1936); 17 (1937); 19 (1939).
3. CIUCA, Riv. di Malariol., 14, suppl. n. 2, 21 (1935).
4. CHOPRA e MKERJIEC, Indian med. gaz., 71, 34 (1936).
5. CORRADETTI, Riv. di Malariol., 15, 161 (1936).
6. SERGENT, Riv. di Malariol., 14, suppl. n. 1 (1935).

