

14. R. NEGRI e L. RAVAIOLI. — Gli antigeni antibiotati e formolati nella produzione del siero agglutinante il V. comma.

Riassunto. — Gli AA. hanno immunizzato quattro gruppi di conigli con quattro antigeni colerici uccisi rispettivamente con formolo, aureomicina, cloromicetina e terramicina. L'antigene formolato si è dimostrato più tossico degli antigeni trattati coi su accennati antibiotici. I sieri ottenuti dai conigli immunizzati con antigeni antibiotati hanno dato titoli in anticorpi agglutinanti superiori a quelli ottenuti dagli animali trattati con antigene formolato. L'antigene ucciso con la terramicina ha dato inoltre sieri con elevato titolo di anticorpi agglutinanti e farebbe pensare ad un'azione stimolante specifica di questo antibiotico sui processi di immunità acquisita.

Résumé. — Avec des antigènes du choléra tués par du formole, de l'aureomycine, de la cloromycetine ou de la terramycine, les AA. ont immunisé quatre groupes de lapins. L'antigène au formole a donné une réaction plus toxique que les autres antigènes.

Les sérums obtenus des lapins immunisés avec les antigènes préparés avec les antibiotiques ont donné, dans les anticorps agglutinants, des titres plus élevés que ceux obtenus des animaux traités avec l'antigène formolé.

L'antigène tué par la terramycine a fourni, en outre, du sérum avec un titre élevé d'anticorps agglutinants. Cette circonstance fait supposer la présence d'une action stimulante spécifique de cet antibiotique sur les procès de l'immunité acquise.

Summary. — The AA. have immunized four groups of rabbits with four cholera antigens after killing the bacteria with formol, aureomycin, chloromycetin and terramycin respectively. The formol treated antigens were more toxic than the other antigens treated by the above mentioned antibiotics.

The sera obtained from the rabbits immunized by the antibiotic treated antigens gave higher agglutinin titres than those obtained from animals treated with formol-treated antigen.

The antigen obtained from the terramycin-treated bacteria gave sera with a high agglutinin titre, which perhaps could be explained by the assumption that this antibiotic possesses a specific stimulating activity upon the processes of acquired immunity.

Zusammenfassung. — Die VV. haben vier Kaninchengruppen immunisiert und zwar mit vier Cholera-Antigene die beziehungsweise durch Formol, Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin getötet wurden.

Das Formol-Antigen bewies sich mehr giftig als die anderen untersuchten Antigene, die mittlest den oben genannten Antibiotica behandelt wurden.

Die Sera der mit antibiotisierten Antigene immunisierten Kaninchen ergaben höhere Titer als die, die von Tieren die mit Formol-Antigen behandelt wurden.

Das durch Terramycin ertötetes Antigen hat ausserdem Sera mit hohen Titer von agglutinierende Antikörper erzeugt. Dieser Umstand erweckt die Vermutung einer spezifischen erregenden Wirkung dieses Antibioticum auf den Prozessen der erworbenen Immunität.

La scoperta degli antibiotici, il loro sempre più crescente impiego e i brillanti risultati che si ottengono nelle malattie sostenute da batteri, rickettsie e da alcuni tipi di virus, hanno fatto pressochè abbandonare l'uso dei presidi immunizzanti a scopo terapeutico. Però, se la scoperta e l'impiego in terapia di sempre nuovi antibiotici ha risolto in modo brillante e indubbio problemi di ordine clinico e terapeutico, ha altresì posto in evidenza altri importanti quesiti. Così la clinica ci dimostra ogni giorno con quanta facilità recidivano le affezioni da piogeni, con quale frequenza avvengono riprese della malattia tubercolare dopo i rapidi e insperati miglioramenti iniziali e le facili recidive della febbre tifoide, dopo il trattamento con gli antibiotici specifici. Quindi, oltre ai concetti di antibiotico-resistenza e di antibiotico-dipendenza degli agenti responsabili di malattie infettive si va profilando sempre più il problema relativo alla immunità acquisita dei soggetti affetti da malattie infettive e trattati con gli antibiotici. Sembrerebbe pertanto che le recidive e le riprese delle malattie infettive combattute con gli antibiotici, oltre essere legate a fenomeni di antibiotico-resistenza, siano dovute alla rapida azione dell'antibiotico che apporterebbe perturbamenti metabolici nell'agente infettante. Basterebbe ciò a spiegare la diminuita o mancata stimolazione indispensabile per la formazione degli anticorpi specifici nell'organismo colpito? E quindi la mancata creazione di uno stato immunitario stabile e duraturo? D'altra parte, l'antibiotico venuto a contatto con l'organismo ammalato potrebbe pure apportare in questi delle variazioni bio-umoralì, ematiche, endocrine, metaboliche, enzimatiche ed immunologiche di varia natura. Queste supposizioni, porterebbero a pensare che in nessuno dei casi si raggiungerebbe quel particolare equilibrio immunitario che è indice di stabile e duratura guarigione, specialmente ottenibile in alcune malattie risoltesi per guarigione spontanea o con cure sintomatiche aspecifiche o con presidi immunizzanti (ad es. la febbre tifoide, la melitense, la tubercolosi per quanto riguarda la patologia umana e il mal rossino per quel che concerne quella

veterinaria). Pertanto, molti AA. (Secco e Vittone, Murano, Grassi ecc.) ⁽¹⁾ allo scopo di evitare tali recidive, hanno impiegato nei casi specifici della febbre tifoide, di altre salmonellosi e della brucellosi, streptomina e vaccino, ottenendo risultati brillanti e duraturi.

Anche nell'infezione ruspatica del suino, diversi AA. (Servettaz, Diernhofer, ecc.) ⁽²⁾, consigliano l'uso associato di penicillina e siero dato che è stato notato come l'uso del solo antibiotico lasciasse gli animali completamente privi di immunità e facilmente soggetti a recidive alla malattia.

Foster e coll. ⁽³⁾, Woodward e coll. ⁽⁴⁾, Borolossy e coll. ⁽⁵⁾ per evitare ricadute della febbre tifoide consigliano l'impiego simultaneo della cloromicetina e della sulfodiazina.

Di parere contrario sono invece Foshay e Pasternack ⁽⁶⁾, i quali comunicarono che soggetti affetti da tularemia, da loro trattati con sola streptomina, guarirono in breve tempo raggiungendo una solida e persistente immunità con presenza di agglutinine specifiche a titolo elevato anche per molti mesi dopo l'avvenuta guarigione.

Recentemente, diversi AA. (Nassi, Ulivelli, Levaditi, Veillet, Corda, Meoni, Baroni e coll., Babich e Spangaro, Leonardi e Mura, Brucellato, Periti, Pasquinucci, Canova, Bulgarelli, Stefanutti, Bazzigalupo e Gemmi, Donatelli e Pasquinucci, Egidi, ecc.) ⁽⁷⁾, allo scopo di chiarire e risolvere tale questione si sono orientati su ricerche riguardanti il comportamento dei meccanismi di difesa organica, delle variazioni delle costanti ematiche e umorali e le particolari modificazioni di ordine allergico-immunitario a seguito del trattamento con gli antibiotici.

Così Tripodo ⁽⁸⁾, ha dimostrato in via sperimentale che la streptomina esplica un'azione deprimente e sfavorevole sugli indici di difesa organica (potere opsonico, potere complementare, tasso anticorpi agglutinanti, ecc.), sia su conigli normali che in quelli contemporaneamente immunizzati contro il tifo.

Alle stesse conclusioni giunge Caputi ⁽⁹⁾ nel corso di vaccinazione sperimentale antitifica nelle cavie, rilevando che la somministrazione di streptomina per via sottocutanea, limiterebbe nettamente la produzione di agglutinine antitifiche. Inoltre, il vaccino antitifico, tenuto a contatto con streptomina perderebbe addirittura il suo potere antigene.

SCOPO DEL LAVORO E TECNICA USATA.

Dalla discordanza dei sopra accennati risultati di ordine clinico e sperimentale, abbiamo creduto opportuno svolgere ricerche intese a chiarire in via sperimentale se l'azione « in vitro » degli antibiotici nei confronti di un antigene batterico svolga azione deprimente o stimolante sui processi di im-

munità acquisita da parte dell'organismo infettato artificialmente. E precisamente abbiamo voluto vedere se un antigene costituito da tre ceppi di V. comma mescolati (Inaba, Giappone, El Korein) uccisi coi più recenti antibiotici (particolarmente attivi verso questo germe) e inoculato endovena in conigli, stimolasse o deprimesse la produzione di anticorpi agglutinanti.

PREPARAZIONE DELL'ANTIGENE.

Furono seminate due Roux coi tre ceppi di V. comma e dopo 48h. di termostato a 37°C. le patine batteriche vennero raccolte in soluzione fisiologica. Il valore opacimetrico di tale sospensione batterica corrispondeva al tubo n. 3 del Wellcome. Parte di tale sospensione fu formolata al 4 per mille come si è soliti fare per la produzione dei sieri agglutinanti dopo quanto ha dimostrato Levi della Vida ⁽¹⁰⁾ in esperienze di immunizzazione di conigli in cui ha potuto constatare la netta superiorità del formolo in confronto di altri antisettici circa il miglior rendimento in anticorpi. Un'altra parte della sospensione batterica fu aggiunta di 2mgr/cc. di aureomicina, un'altra di 1 mgr./cc. di cloromicetina e un'ultima di 1 mgr./cc. di terramicina. Tali quantità di antibiotico sono state trovate come le minime quantità sufficienti ad uccidere l'antigene da noi preparato senza però provocare la lisi dei germi. Le sospensioni batteriche antibiotate furono messe in termostato a 37°C. per 10 giorni; giornalmente furono fatte semine sui comuni terreni che rimasero costantemente sterili anche dopo 10 giorni di soggiorno in termostato. L'antigene formolato fu lasciato 24 h. in termostato a 37°C., tempo che risultò sufficiente per l'uccisione dei germi.

I conigli scelti per la produzione dei sieri agglutinanti il V. comma furono 24 e furono divisi in quattro gruppi di sei conigli ciascuno. Ogni gruppo fu pesato prima di essere trattato coi rispettivi antigeni preparati come sopra detto. La prima iniezione dei vari antigeni fu fatta sottocute alla dose di cc. 0,10; tre giorni dopo gli antigeni furono iniettati in vena alla dose di cc. 0,10; una terza iniezione endovenosa di cc. 0,40 fu fatta tre giorni dopo; la quarta iniezione endovenosa fu fatta tre giorni dopo e alla dose di cc. 0,80 mentre l'ultima endovenosa fu eseguita cinque giorni dopo pure alla dose di cc. 0,80 (v. tabella n. 1). Dopo sette giorni di riposo i conigli furono nuovamente pesati e salassati in bianco. Durante il trattamento immunizzante si perdette un solo coniglio trattato con antigene formolato e venuto a morte due giorni dopo l'ultima iniezione. Le condizioni generali dei conigli prima del salasso erano discrete per quelli trattati con antigeni antibiotati, mentre quelli trattati con antigene formolato si presentavano in pessime condizioni evidenziando così la maggior tossicità dell'antigene formolato.

[illegible]

Il peso degli animali all'inizio e alla fine del trattamento è riportato nella tabella n. 2; da questa si rileva come gli animali trattati con antigene formolato, che prima del trattamento si trovavano in migliori condizioni di salute ed erano di peso superiore a quello degli altri tre gruppi, abbiano perso

TABELLA N. 2

Antigeni uccisi con:	Media dei pesi dei conigli		Media dei titoli agglutinanti
	prima del trattamento	dopo il trattamento	
Aureomicina	Kg. 2,300	Kg. 2,210	1: 4.000
Cloromicetina	» 2,180	» 2, —	1: 4.000
Terramicina	» 2,350	» 2,170	1.10.666
Formolo 4 ‰	» 2,800	» 2,550	1: 3.600

in media 250 gr. di peso pro capite. I conigli trattati con antigene ucciso con aureomicina perdettero in media gr. 90 a testa; quelli trattati con antigene ucciso con cloromicetina persero in media 180 gr. pro capite come quelli trattati con antigene ucciso con terramicina.

Da questi risultati è possibile subito rilevare come l'antigene formolato abbia svolto un'azione tossica superiore a quella svolta dagli altri tre antigeni, trattati con gli antibiotici in questione. Tale maggiore azione tossica si è esplicata con la perdita di un coniglio dopo l'ultima iniezione, con una maggior perdita in peso e con le pessime condizioni generali degli animali a trattamento ultimato.

I titoli in anticorpi agglutinanti evidenziati nei 23 sieri esaminati sono riportati nella tabella n. 1, mentre nella tabella n. 2 vengono riferite le medie dei titoli degli anticorpi agglutinanti dei sieri ottenuti dagli animali immunizzati coi quattro diversi antigeni. Da quest'ultima tabella risulta che l'antigene formolato è stato quello a dare un titolo medio in anticorpi lievemente inferiore (1:3.600) a quello ottenuto dagli antigeni uccisi con cloromicetina e aureomicina (entrambi 1:4.000); l'antigene ucciso con la terramicina ha dato invece dei titoli molto più elevati la cui media è di 1:10.666.

CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI.

Dalle ricerche sopra esposte si è evidenziato quanto segue:

1) I tre gruppi di conigli immunizzati con gli antigeni colerici uccisi rispettivamente con aureomicina, cloromicetina, e terramicina, alla fine del

trattamento si trovavano ancora in buone condizioni generali di salute; nessun coniglio di questi gruppi venne a morte. Gli animali invece trattati con antigene formolato al 4 per mille vennero a trovarsi, a immunizzazione ultimata, in scadenti condizioni generali di salute e subirono una maggior perdita di peso; un coniglio venne a morte dopo l'ultima inoculazione. Tutto ciò fu dovuto alla maggiore azione tossica dell'antigene formolato nei confronti degli altri tre antigeni trattati rispettivamente con gli antibiotici in questione.

2) I sieri dei conigli trattati con antigene formolato diedero il minor titolo medio in anticorpi agglutinanti (1:3.600) a confronto di quelli ottenuti dagli animali immunizzati con gli antigeni uccisi con aureomicina, o cloromicetina (entrambi 1:4.000) e terramicina (1:10.666).

Pertanto i nostri risultati non concordano con quelli ottenuti da Caputi (9) con streptomycin nel tifo sperimentale.

I nostri risultati, nel caso particolare della preparazione dei sieri agglutinanti il V. comma, escluderebbero innanzi tutto un'azione deprimente degli antibiotici, mentre nel caso particolare dell'antigene ucciso « in vitro » con la terramicina, dimostrerebbe che questo antibiotico svolge notevole azione stimolante sui processi di immunità acquisita.

Se questa azione favorevole circa la produzione di anticorpi agglutinanti sia specifica solo per il V. comma e sia provocata solo dalla terramicina sarà ulteriormente chiarito in altre ricerche che sono in corso.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SECCO, VITTONE - Atti I Congresso Naz. antib., a cura del C.I.S.A., Milano (1948).
— MURANO G. - Idem.
— GRASSI A. - Idem.
- (2) J. SERVETTAZ - Bull. Acad. Vet. de France, XXII, 117 (1949).
— K. DIERNHOFER - Wiener tierartz. Monat., maggio (1950).
- (3) FOSTER W. D. e Coll. - J.A.M.A., 141, 131 (1949).
- (4) WOODWARD e Coll. - Ann. Int. Med., 29, 131 (1948).
- (5) BOROLOSSY A. W. e Coll. - The Lancet, 1, 559 (1949).
- (6) FOSHAY L. - Am. J. Med., 1, 180, 1946; 2, 467 (1947).
— PASTERNAK A. B. - J.A.M.A., 130, 393 (1946).

- (7) NASSI L., GIUSTI M. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 24, 961 (1948).
— ULIVELLI P. - Idem, 24, 708, 956 (1948).
— LEVADITI C., VEILLET J. - Rev. d'Imm. e Ther. Antim., 2, 296 (1947).
— CORDA M., MEONI P. - Riv. Ist. Sier. Ital., 23, 247 (1948).
— BARONI e Coll. - Atti I Congresso Antib. a cura del C.I.S.A., Milano (1948).
— BABICH S., SPANGARO L. - Min. Med., 1, 161 (1949).
— LEONARDI G., MURA O. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 24, 1074 (1948).
— BRUCELLATO G. - Riv. Ped. Sicil., 2, 575 (1947).
— PERITI P., PASQUINUCCI e Coll. - Riv. Clin. Ped., 47 (1949).
— CANOVA F. - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 24, 976 (1948).
— BULGARELLI R. - Policl. inf. (10), (1948).
— STEFANUTTI - Il Policlinico (Sez. prat.), 56, 181 (1949).
— BAZZIGALUPO C., GEMMI M. - Bol. Soc. It. Biol. Sper., 24, 647 (1948).
— DONATELLI L., PASQUINUCCI - Boll. Soc. It. Biol. Sper., 24, 963 (1948).
— EGIDI E. - Atti I Congresso Naz. Antib. a cura C.I.S.A., Milano (1948).
(8) TRIPODO C. - Bollettino I.S.M., XXIX gennaio-febbraio (1950).
(9) CAPUTI F. - Giorn. Batt. imm., XLI, 7-8 gennaio-febbraio (1950).
(10) LEVI DELLA VIDA M. - Trattato ital. igiene, epid., gennaio, 249 (1930).
-