

65. Stefano ORBAN. — Vaccini purificati e precipitati contro il colera e contro il tifo, paratifo e colera.

Riassunto. — Si espone la preparazione di un vaccino precipitato contro il colera e di uno misto contro il tifo, paratifo A, paratifo B, e colera e i risultati degli esperimenti fatti con questi vaccini su animali.

Gli antigeni necessari per il vaccino furono preparati autolisando i batteri con ripetuto congelamento e scongelamento. Si purificarono gli antigeni attraverso dializzazione e successive precipitazioni e poi si adsorbirono con idrossido di alluminio. Il vaccino fu somministrato a conigli e a cavie, ed a scopo comparativo si fecero esperimenti paralleli con sospensioni di batteri uccisi con formalina 0,5%. Con una sola inoculazione del vaccino precipitato si raggiungono migliori risultati che con la triplice somministrazione della sospensione dei batteri uccisi con la formalina. L'inoculazione dei vaccini non ha causato alcuna reazione locale e generale. Negli animali trattati col vaccino precipitato la produzione delle agglutinine comincia più presto, raggiunge un titolo più alto e diminuisce molto più lentamente che negli animali vaccinati con la sospensione di batteri uccisi con formalina. L'inoculazione del vaccino precipitato anticolerico ha difeso gli animali contro l'infezione più volte letale, più efficacemente che la sospensione batterica formalinizzata. Il siero dei conigli trattati col vaccino precipitato inoculato nelle cavie, ha conferito una immunità di grado tale alla prova di infezione, che tutti gli animali sono rimasti in vita.

Résumé. — On expose la préparation d'un vaccin précipité contre le choléra et d'un vaccin mixte contre le typhus, le paratyphus A, le paratyphus B et le choléra, ainsi que les résultats des expériences effectuées avec ces vaccins sur les animaux.

Les antigènes nécessaires pour le vaccin ont été préparés en autolysant les microbes par des opérations répétées de congélation et décongélation. On a purifié les antigènes à travers une dialysation et des précipitations successives, et ensuite on les a laissés adsorber avec l'hydroxyde d'aluminium. Le vaccin a été administré à des lapins et des cobayes, et l'on a fait, aux fins de comparaison, des expériences parallèles avec des sus-

pensions de microbes tués avec formaline à 0,5%. Par une seule inoculation du vaccin précipité on obtient des résultats meilleurs que par une triple administration de la suspension de microbes tués avec la formaline. L'inoculation des vaccins n'a causé aucune réaction locale ou générale. Dans les animaux traités avec le vaccin précipité la production des agglutinines commence plus tôt, atteint un taux plus élevé et diminue beaucoup plus lentement que chez les animaux vaccinés avec la suspension de microbes tués avec la formaline. L'inoculation du vaccin précipité anticholérique a protégé les animaux contre l'infection plusieurs fois mortelle, plus efficacement que la suspension microbienne formalisée. Le sérum des lapins traités avec le vaccin précipité inoculé aux cobayes a conféré une immunité d'un tel degré à l'essai d'infection, que tous les animaux sont restés en vie.

Summary. — The preparation is described of a precipitated vaccine against cholera and of a mixed one against typhus, paratyphus A, paratyphus B and cholera, as well as the results obtained from experiments made with these vaccines on animals.

The antigens required for the vaccine were prepared by effecting the autolysis of the bacteria through a repeated process of freezing and thawing. The antigens were purified through dialyzation and successive precipitations, whereupon they were adsorbed with aluminium hydroxide. The vaccine was administered to rabbits and guinea-pigs, and for purposes of comparison parallel experiments were performed with suspensions of bacteria killed with 0,5% formalin. By a single inoculation of the precipitated vaccine better results are obtained than by the triple administration of the suspension of bacteria killed by formalin. The inoculation of the vaccines did not cause any local or general reaction. In animals treated with precipitated vaccine the production of agglutinins begins sooner, reaches a higher proportion and decreases at a much slower rate than in animals vaccinated with the suspension of bacteria killed with formalin. The inoculation of the precipitated vaccine against cholera afforded protection of the animals against infection several times lethal, more effectively than the suspension of bacteria treated with formalin. The serum of rabbits treated with the precipitated vaccine inoculated to guinea-pigs conferred an immunity to such a degree at the infection test, that all of the animals remained alive.

Zusammenfassung. — Es wird die Herstellung eines präzipitierten Vakzins gegen Cholera, ferner eines gemischten Vakzins gegen Typhus, Paratyphus A, Paratyphus B, und Cholera beschrieben, worauf die Ergebnisse der mit diesen Vakzinen auf Tiere gemachten Versuche angegeben werden.

Zur Herstellung der für das Vakzin erforderlichen Antigene wurde eine mittels wiederholter Gefrier - und Wiederauftaubehandlung herbeigeführte Autolyse der Bakterien verwendet. Die Reinigung der Antigene wurde durch Dialysieren und darauffolgende Ausfällungen durchgeführt, dann wurden sie mit Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Das Vakzin wurde in Kaninchen und Meerschweinchen injiziert, und zu Vergleichungszwecken wurden parallele Versuche mit Aufschwemmungen von Bakterien durchgeführt, die mit 0,5% - igem Formalin getötet worden waren. Mit einer einzigen Inokulation des präzipitierten Vakzins werden bessere Ergebnisse als mit einer dreifachen Injektion der Aufschwemmung der mit Formalin getöteten Bakterien erzielt. Die Inokulation der Vakzine hat keine lokale oder allgemeine Reaktion verursacht. Bei Tieren, die mit präzipitiertem Vakzin behandelt worden sind, beginnt die Erzeugung der Agglutinine früher, erreicht einen höheren Titer, und nimmt dann viel langsamer ab als bei Tieren, die eine Aufschwemmung von mit Formalin getöteten Bakterien erhalten haben. Die Inokulation des präzipitierten Anticholera-Vakzins hat die Tiere gegen die mehrmals tödliche Infektion wirksamer geschützt als die mit Formalin präparierte Aufschwemmung von Bakterien. Das Serum von Kaninchen, die mit dem präzipitierten in Meerschweinchen inokulierten Vakzin behandelt worden sind, hat den Tieren beim Infektionsversuch eine solche Immunität verliehen, dass sie alle am Leben geblieben sind.

Un buon vaccino deve avere le seguenti qualità:

- 1) Assicurare una immunità elevata e duratura;
- 2) Richiedere un limitato numero di inoculazioni e preferibilmente una sola;
- 3) Causare minime reazioni postvaccinali.

Le ricerche per migliorare i vaccini devono essere fatte, pertanto, tenendo conto dei suddetti criteri.

I vaccini comunemente usati sono per la maggior parte sospensioni di batteri uccisi e privati di virulenza, colture in brodi filtrati. Questi vaccini contengono oltre la materia specifica (l'antigeno) molte altre materie superflue, come: brodo, prodotti di decomposizione delle proteine, polisaccaridi non antigeni, sali varii ecc. Tali impurità non prendono parte all'immunizzazione ma aumentano considerevolmente le reazioni postvaccinali. Di solito, a causa appunto, delle reazioni postvaccinali non si può inoculare in una sola volta una quantità sufficiente di antigeno, e siccome l'antigeno si elimina molto presto dall'organismo, si assicura l'immunità aumentando il numero delle vaccinazioni.

Da quando i metodi fisico-chimici sono andati acquistando via via maggiore importanza nella immunologia, si è cercato di applicare gli antigeni in forma purificata. La purificazione degli antigeni si è fatta secondo due punti di vista:

a) *Teorico*: studiare e conoscere le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche degli antigeni.

b) *Pratico*: produrre gli antigeni sempre più efficaci e più concentrati, a scopo di immunizzazione.

Le prime ricerche di purificazione sono state fatte con esotossine e precisamente con le tossine difterica e tetanica, e soltanto più tardi si è passati allo studio delle endotossine. Già nel 1889 Roux e Yersin ⁽¹⁾ fecero ricerche di purificazione sulla tossina difterica. Dopo di ciò varii studiosi come Brieger e Boer ⁽²⁾, Glenny e Walpole ⁽³⁾, Watson e Wallace ⁽⁴⁾, Koulikoff e Smirnov ⁽⁵⁾, Sedallian e Gaumont ⁽⁶⁾, Kissin e Bronstein ⁽⁷⁾, Leulier, Sedalian e Calvel ⁽⁸⁾, Schmidt ⁽¹⁰⁾ purificarono le tossine difteriche e tetaniche. Degli studi sulle endotossine si occuparono soprattutto Dochez

(1) ROUX e YERSIN, Ann. Inst. Pasteur Vi., 273 (1889).

(2) BRIEGER e BOER, Zschr. f. Hyg., 21, 259 (1896).

(3) GLENNY e WALPOLE, Journ. Hyg., 9, 298 (1915).

(4) WATSON e WALLACE, Journ. Path. and Bact., 24, 289 (1924).

(5) KOULIKOFF e SMIRNOV, Ann. Inst. Pasteur, 41, 1166 (1927).

(6) SEDALLIAN e GAUMONT, C. r. S. Biol., 97, 93 (1927).

(7) KISSIN e BRONSTEIN, Zschr. f. Imm., 56, 11 (1928).

(8) LEULER, SEDALLIAN e CLAVEL, C. r. S. Biol., 99, 1746 (1928).

(9) RAMON, C. r. S. Biol., 98, 1504 (1928).

(10) SCHMIDT, Zschr. f. Imm., 59, 82 (1928).

e Avery (¹¹), Boivin e Mesrobeanu (¹²), Raistrick e Topley (¹³), Wagner Jauregg (¹⁴) ecc. Essi osservarono però che l'efficacia immunizzante delle tossine troppo purificate è minore di quella delle tossine brute, anzi in qualche caso può mancare del tutto. Schmidt, Hansen e Kjaer (¹⁵) hanno constatato che, benchè la flocculazione della tossina purificata sia uguale a quella greggia, la tossina purificata si scompone molto presto. Schmidt e Nemayer trovarono che la tossina difterica completamente purificata perde la maggior parte delle sue proprietà antigeniche (¹⁶). Poichè la purificazione esagerata può nuocere all'efficacia immunizzante dell'antigeno, questo metodo, benchè abbia portato a importantissime scoperte teoriche, in pratica viene adottato in un campo molto limitato.

Gli antigeni si eliminano molto presto dall'organismo. Johann (¹⁷) esaminò nei preparati istologici i bacilli di tifo inoculati nel tessuto connettivo e constatò che 22 ore dopo la vaccinazione si trovavano appena alcuni bacilli fagocitati e tre giorni dopo, non se ne trovavano affatto. Glenny, Buttle e Stewens (¹⁸) osservarono che l'anatossina difterica liquida in 24 ore si elimina completamente dall'organismo. Cercarono di impedire o almeno di ritardare, l'eliminazione dell'antigeno in diversi modi. Il primo risultato pratico fu raggiunto da Ramon (¹⁹) quando per l'immunizzazione dei cavalli aggiunse alla anatossina diverse materie come: tapioca, agar-agar, CaCl_2 . Con l'aiuto di queste materie non specifiche potè aumentare l'effetto dell'antigeno. Spiegò questa attivazione con la infiammazione prodotta dalla materia estranea nel punto di inoculazione. L'edema formatosi ritarda l'eliminazione e il riassorbimento dell'antigeno; inoltre una parte dell'antigeno si fissa alla materia estranea e anche ciò rallenta la eliminazione. L'organismo in questo modo può utilizzare l'antigeno più economicamente per l'immunizzazione. Per ritar-

(¹¹) DOCHEZ e AVERY, J. exp. Med., 26, 477 (1917).

(¹²) BOIVIN e MESROBEANU, C. a. S. Biol., 124, 1176 (1937).

(¹³) RAISTRICK e TOPLZEY, Brit. J. exp. Path., 15, 113 (1934).

(¹⁴) WAGNER, JUAREGG e HELMERT, Die Chemi., 55, 21 (1924).

(¹⁵) SCHMIDT, HANSEN e KJAER, Ann. Inst. Pasteur, 46, 202 (1931).

(¹⁶) SCHMIDT e NIEMAYER, Behringwerk Mitt. 6, 153 (1934).

(¹⁷) JOHANN, Orvosi hetilap, 67, 17 (1918).

(¹⁸) GLENNY, BUTTLE e STEVENS, J. of Path., 32, 275 (1929).

(¹⁹) RAMON, Ann. Inst. Pasteur, 47, 339 (1931).

dare il riassorbimento e l'eliminazione dell'antigeno si sono studiate diverse sostanze. Studiando l'adsorbimento con i sali metallici si è trovato che questi non soltanto aumentano l'effetto dell'antigeno, ma rendono possibile anche la concentrazione e purificazione dell'antigeno stesso, Roux e Yersin ⁽¹⁾ hanno utilizzato il CaCl_2 , Zunz ⁽²⁰⁾ l'acido silicico, Bitz, Much e Siebert lo idrossido di zinco e di ferro. Ma i risultati più significativi si sono raggiunti con l'applicazione dell'idrossido di alluminio. Glenny, Pope Waddington e Wallace ⁽²¹⁾ hanno pubblicato nel 1926 che l'efficacia immunizzante dell'anatossina difterica, precipitata con l'allume, si moltiplica. Hawens e Welles ⁽²²⁾ Schmidt e Hansen ⁽¹⁵⁾ trovarono che oltre il rallentamento del riassorbimento dell'antigeno, si può raggiungere con questo metodo anche un alto grado di purificazione e concentrazione dell'antigeno. L'antigeno adsorbito con idrossido di alluminio si libera lentamente e sviluppa per lungo tempo il suo effetto nell'organismo.

Schmidt ⁽²³⁾ adsorbì con l'idrossido di alluminio una dose di tossina difterica e tetanica più volte letale e la inoculò agli animali. Questi sopravvissero, e ciò prova che la tossina non si libera in quantità tale da uccidere l'animale. In questo modo sotto forma di precipitato si possono introdurre nell'organismo grandi quantità di antigeno.

Il meccanismo dell'effetto dell'antigeno precipitato si spiega in diversi modi. In prima linea l'antigeno passa da uno stato di soluzione trasparente ad uno stato di precipitato che di per se stesso porta un cambiamento notevole. Schmidt dimostrò che nelle immunizzazioni è importante la grandezza della micella dell'antigeno, e siccome l'adsorbente ingrandisce considerevolmente la superficie del complesso dell'antigeno ne cambia anche la potenza immunizzante. E' stato inoltre provato che, con l'aiuto di adsorbenti non specifici, si possono trasformare anche gli apteni in antigeni. Plaut e Rudy ⁽²⁴⁾ trasformarono gli apteni lipoidici, Unlenhut e Remy ⁽²⁵⁾ il glicogeno in antigeno, mediante idrossido di alluminio.

⁽²⁰⁾ ZUNZ, Zschr. f. Imfschg., 19, 326 (1931).

⁽²¹⁾ GLENNY, POPPE, WADDINGTON e WALLACE, J. of Path., 29, 31 (1926).

⁽²²⁾ HAVENS e WELLS, J. of inf. Dis., 53, 138 (1933).

⁽²³⁾ SCHMIDT, C. r. S. Biol., 107, 330 (1931).

⁽²⁴⁾ PLAUT e RUDY, Z. Imfschg., 81, 87 (1933).

⁽²⁵⁾ UHLENHUT e REMY, Z. Imfschg., 92, 171 (1938).

Anche le tossine eccessivamente purificate, che hanno — come si è detto — debole efficacia immunizzante, legate ad adsorbenti non specifici si trasformano in ottimi antigeni.

Si sono fatte ricerche anche con vari virus adsorbendoli a sostanze non specifiche. C.P.R. Roads ⁽²⁶⁾ ha adsorbito il virus della poliomielite, Schmidt il virus dell'afta epizootica ⁽²⁷⁾, coll'idrossido di alluminio e con questi preparativi hanno praticato l'immunizzazione.

L'effetto aumentato è conseguenza, oltre che del cambiamento della miscela immunizzante, anche del rallentato riassorbimento. Secondo Harrison ⁽²⁸⁾ Schmidt e Burbach ⁽²⁹⁾ in conseguenza del rallentato riassorbimento lo stimolo dell'antigeno può farsi valere più a lungo. Le ricerche di Farago ⁽³⁰⁾ sulla anatossina difterica provano che lo antigeno precipitato resta per molto tempo nel punto dell'inoculazione, pur conservando il suo potere immunizzante. Farago asportò dal tessuto connettivo della cavia il precipitato inoculato e lo trapiantò in una altra cavia. Constatò che il precipitato aveva conservato il carattere di antigeno anche 38 giorni dopo l'inoculazione, dato che, trapiantato in un altro animale, lo difese contro una dose di tossina più di cento volte letale. Dalle suddette ricerche si può dedurre che l'antigeno precipitato corrisponde nello stesso tempo allo stimolo primario e secondario, dato che esercita a lungo un continuo stimolo, e in tal modo si verifica una regola fondamentale dell'immunologia, che per l'immunizzazione sono necessari ripetuti stimoli d'antigeni. Ho fatto esperimenti ⁽³¹⁾ di trapianto di endotossine dissenteriche adsorbite con idrossido di alluminio, ed ho esaminato, in preparati istologici, le reazioni avvenute nel tessuto connettivo sottocutaneo. I risultati delle ricerche hanno dimostrato che l'antigeno precipitato si libera gradatamente e perciò non esercita un effetto nocivo sull'organismo. Ho inoculato senza alcun effetto nocivo per gli animali endotossine sotto forma di precipitato in quantità tali, che sotto forma di soluzione sareb-

⁽²⁶⁾ ROADS, Science, 72, 608 (1930).

⁽²⁷⁾ SCHMIDT, Zschr. Imfschg., 92, 338 (1938).

⁽²⁸⁾ HARRISON, Publ. Healt Rep., 55, 193 (1938).

⁽²⁹⁾ SCHMIDT e BURBACH, Zbl. Bakter, 137, 122 (1926).

⁽³⁰⁾ FARAGO, Zschr. Imfschg., 86, 191 (1935).

⁽³¹⁾ ORBAN, in corso di pubblicazione.

bero state più volte mortali. Nel punto della inoculazione si produce un processo infiammatorio, che in alcuni giorni si isola nettamente dall'ambiente. In seguito si forma una capsula di tessuto connettivo intorno al precipitato, mentre nell'interno si vedono capillari. In conclusione anche le ricerche suddette dimostrano che il vaccino precipitato forma nell'organismo un vero deposito di antigene. Questo deposito è ben separato dai tessuti vicini, mentre i capillari che esistono nell'interno assicurano il trasporto dell'antigene nel circolo.

Per la loro capacità di aumentare l'effetto dell'antigene, gli adsorbenti non specifici, e specialmente l'idrossido di alluminio, vengono molto usati nella preparazione dei vaccini. Questo metodo, oltre ad immunizzare meglio rende possibile la riduzione del numero delle vaccinazioni e anche le reazioni postvaccinali sono più leggere. Coll'anatossina difterica precipitata basta una sola vaccinazione per la immunizzazione, sistema che rende più facile risolvere il problema delle vaccinazioni obbligatorie, e che perciò viene via via adottato in nuovi Paesi. Con il vaccino precipitato usato con ottimi risultati da Lovrekovich e Rauss ⁽³²⁾ anche la difesa contro il tifo è ridotta ad una unica vaccinazione. Orban ⁽³³⁾ ha preparato il vaccino antidissenterico polivalente adsorbendo gli antigeni purificati a idrossido di alluminio. Inoltre il vaccino antitetanico di Glenny ⁽³⁴⁾ e di Bergey e Etris ⁽³⁵⁾, il vaccino contro le pertosse di Harrison ⁽³⁶⁾, l'anatossina stafilococcica precipitata di Forrel e Kitching ⁽³⁷⁾ dimostrano l'efficacia di questo metodo di immunizzazione. Con questi prodotti sono stati vaccinati un gran numero di persone e i dati statistici riferiscono ottimi risultati.

Nel presente lavoro voglio rendere conto delle ricerche eseguite col vaccino contro il colera e con il vaccino contro il tifo, paratifi e colera, preparati secondo i suddetti principi.

⁽³²⁾ LOVREKOVICH e RAUSS, *Zschr. F. Imfschg.*, 191, 194 (1942).

⁽³³⁾ ORBAN, *Schweizerische Zscr. F. Path. u Bakt.*, 7, 535 (1944).

⁽³⁴⁾ GLENNY, *Rit. Med. J.*, 2, 244 (1930).

⁽³⁵⁾ BERGEY e ETRIS, *Amer. J. Publ. Health*, 24, 582 (1934).

⁽³⁶⁾ HARRISON, *Publ. Health Rep.*, 55, 793 (1938).

⁽³⁷⁾ FORREL e KITCHING, *J. of Imm.*, 34, 51 (1938).

PREPARAZIONE, PURIFICAZIONE E ADSORBIMENTO DEGLI ANTIGENI

Ho estratto gli antigeni dai seguenti ceppi virulenti dalla collezione dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma: tifo 2/ patogeno per i topi, contenente l'antigeno Vi/, paratifo A Roma, paratifo B Pisenti e colera Inaba.

Ho preparato gli estratti di antigene congelando e scongelando le sospensioni batteriche. Questo metodo fu adottato per la prima volta da Grasset ⁽³⁸⁾. Egli ha tenuto a 58° la sospensione dei bacilli di tifo poi li ha autolisati congelando e scongelando ripetutamente. Il suo estratto era di grande valore immunizzante, ma anche la sua tossicità era grande. Per diminuire la tossicità aggiunse all'estratto 0,5% di formalina e lo tenne per un mese nel termostato. Con questa endoanatotossina vaccinò animali e uomini con ottimi risultati ⁽³⁹⁾. Secondo i risultati pubblicati da Vivaldi ⁽⁴⁰⁾, l'estratto di bacilli di tifo lisati attraverso congelamento e scongelamento, è efficace anche per il trattamento dei malati di tifo. Col metodo di Grasset però alcuni antigeni vengono danneggiati. Il riscaldamento altera gli antigeni H e Vi ⁽⁴¹⁾ che hanno una parte importante nell'immunizzazione. Perciò Lovrekovich e Rauss ⁽³²⁾ hanno modificato il metodo originale. Inoltre hanno provato che la formalina non diminuisce la tossicità del filtrato, ma rende inattivo l'antigeno Vi, cambiando con ciò il valore antigene dell'estratto. Questi autori per preparare il loro vaccino antitifico adsorbono l'estratto derivante dal ripetuto congelamento e scongelamento della sospensione vivente, senza aggiungere la formalina a idrossido di alluminio. Con questo vaccino hanno vaccinato centinaia di migliaia di uomini. Le osservazioni sperimentali, statistiche e epidemiologiche hanno dimostrato che con una unica iniezione di questo vaccino si raggiungono migliori risultati, che con i vaccini costituiti da sospensioni di tifo, uccisi e somministrati tre volte. Nelle mie ricerche ho preparato gli estratti di antigeni col metodo modificato di Lovrekovich e Rauss ⁽³²⁾. Ho lavato la coltura del rispettivo ceppo su un tubo di agar, di 24 ore, con 10 cm³ di soluzione fisiologica. Ho seminato di questa sospensione 5 cm³

⁽³⁸⁾ GRASSET, C. r. S. Biol., 115, 96 (1927).

⁽³⁹⁾ GIOVANARDI, Zschr. f. Hyg., 120, 273 (1937).

⁽⁴⁰⁾ VIVALDI, Rend. Ist. Sup. di Sanità, X, 444 (1947).

⁽⁴¹⁾ RAUSS, Zsch. f. Immfschg., 101, 211 (1942).

in una boccia Roux. Ho usato per la coltura del colera brodo-agar di pH 7,4 e per le colture di tifo e paratifo brodo-agar di pH 6,8-7,0. Li ho tenuti per un giorno al termostato poi ho lavato i germi con la soluzione fisiologica. Con l'apparecchio Wellcome ho stabilito il contenuto di germi delle sospensioni. Ho diluito la sospensione per la preparazione del vaccino colerico in modo da contenere 50 miliardi di germi. Per la preparazione del vaccino misto ho mescolato le sospensioni in modo da avere 10 miliardi di germi di tifo, 7,5 miliardi di paratifo A, 7,5 miliardi di paratifo B e 50 miliardi di colera in un centimetro cubico. L'ho versato in palloni chiusi con tappo di gomma e l'ho sottoposto a ripetuti congelamenti e scongelamenti, dopo di che ho passato per il filtro di Seitz. Nel filtrato si trovano intatti gli antigeni O,H e Vi. Nell'estratto mescolato col siero specifico avviene prima una opalescenza poi nella rispettiva miscela una flocculazione. Mi sono servito di questo fenomeno per controllare la quantità di antigene del filtrato. Ma il filtrato contiene oltre gli antigeni specifici anche impurità, come: terreno di coltura, prodotti non antigeni di decomposizione dei batteri, vari cristalloidi ecc. E' da menzionare che Tui e i suoi collaboratori ⁽⁴²⁾ hanno dimostrato che gli agenti pirogeni del tifo non passano per il filtro Seitz. Per eliminare le impurità ho sottoposto il filtrato ad un procedimento di purificazione. A questo scopo ho dializzato il filtrato attraverso il cellofan per 12 ore in acqua corrente e 12 ore in acqua distillata.

Attraverso il cellofan non passano gli antigeni dalle grosse molecole, passano invece vari cristalloidi, prodotti di decomposizione delle proteine e gli idrocarbonati non antigeni. La dializzazione non ebbe per conseguenza perdita di antigene ed infatti, il filtrato dializzato unito con siero specifico lo floccula nella stessa diluizione come l'originario filtrato grezzo. Dopo di ciò ho adsorbito il filtrato dializzato con idrossido di alluminio al 2,5%. Questa concentrazione è la più adatta per praticare l'adsorbimento. Ho ridisciolti gli antigeni precipitati con soluzione di citrato di sodio al 4%. Coll'adsorbimento il contenuto in azoto del filtrato diminuisce, e ciò dimostra come nelle condizioni suddette si adsorbono specialmente i polisaccaridi specifici. Secondo Boivin ⁽⁴³⁾ la funzione di antigene dell'autolisato formalinizzato di Grasset si deve ai glucolipoidi

(42) TUI, BENAGLIA, RUGGIERO e YATES, *Proc. Soc. Biol. e Med.*, 41, 272 (1939).

contenutivi. Ho ripetuto l'adsorbimento e l'eluzione più volte, controllando sempre che la flocculazione specifica restasse identica a quella dell'originario filtrato grezzo. Dopo di ciò ho adsorbito la soluzione purificata di antigene con idrossido di alluminio ho lavato poi il precipitato ripetutamente e l'ho diluito in modo adatto. Questo materiale serve da vaccino definitivo.

EFFETTO ANTIGENICO DEI VACCINI

A) *Vaccino anticolerico*. — L'efficacia ed il valore del vaccino in questione si giudicano nel modo migliore facendo prove comparative con un altro vaccino anticolerico. A tale scopo ho fatto esperimenti paralleli con un altro vaccino costituito da vibroni colerigeni uccisi con la formalina al 0,5%. Questo vaccino conteneva 5 miliardi di vibroni del colera per cm^3 . Ho inoculato i vaccini a cavie e a conigli e ho eseguito le seguenti ricerche:

Reazioni postvaccinali. — Del vaccino precipitato ho inoculato in una sola volta $1,0 \text{ cm}^3$ ai conigli e $0,5 \text{ cm}^3$ alle cavie nel tessuto connettivo sottocutaneo. Colla sospensione batterica trattata con formalina ho vaccinato gli animali tre volte. I conigli hanno ricevuto la prima volta $0,5 \text{ cm}^3$ e poi ad intervalli di 5 giorni $0,5 \text{ cm}^3$ e $1,0 \text{ cm}^3$, mentre le cavie sono state vaccinate con $0,3 - 0,3 - 0,5 \text{ cm}^3$ sotto la cute, anche esse ad intervalli di 5 giorni. Gli animali vaccinati sono stati sotto continuo controllo. Giornalmente ho controllato le reazioni locali ed ho pesato gli animali. Dopo la inoculazione con vaccino precipitato non ho constatato alcun fenomeno patologico; nessun animale è morto in conseguenza della vaccinazione, ed anzi non ha neppure perduto di peso. Al punto di inoculazione nel tessuto sottocutaneo è palpabile, in genere, un piccolo nodulo pieno, che è da attribuirsi al deposito di antigene; non ho riscontrato in nessun caso nè una infiammazione pronunciata, nè necrosi. L'inoculazione della sospensione formalinizzata non ha causato alcun fenomeno patologico nei conigli, mentre le cavie hanno perduto di peso dopo la prima vaccinazione e non hanno riacquisito il loro peso originario che dopo 5 giorni.

Produzione di agglutinine. — Ho cercato il contenuto di agglutinine specifiche nel modo seguente: ho aggiunto $0,5 \text{ cm}^3$ di siero diluito, 2 gocce di sospensione di vibroni colerigeni Inaba viventi, di 24 ore. Dopo aver tenuto le provette 2 ore nel termostato e per 20 ore a temperatura

ambiente ho esaminato il risultato con l'agglutinoscopio. Ho ricercato il titolo agglutinante del siero delle cavia, 12 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Questi animali sono stati poi sottoposti all'infezione e perciò non ho più fatto la titolazione dell'agglutinine nel loro siero. Il risultato è riassunto nella tabella I.

TABELLA I.

TITOLO AGGLUTINANTE DEL SIERO DELLE CAVIE 12 GIORNI DOPO
LA VACCINAZIONE

Vaccinate tre volte con sospensione di batteri trattati alla formalina		Vaccinate una volta con vaccino precipitato	
Cavia N.	Titolo agglutinante	Cavia N.	Titolo agglutinante
1	100	8	800
2	150	9	1.200
3	150	10	400
4	50	11	600
5	100	12	200
6	200	13	300
7	50	14	1.200

Come risulta dalla tabella I il contenuto in agglutinine specifiche del siero delle cavia trattate col vaccino precipitato è molto più alto di quello degli animali vaccinati tre volte con la sospensione trattata con formalina.

Ho esaminato settimanalmente il contenuto di agglutinine nel siero dei conigli. I risultati sono indicati nella tabella II.

TABELLA II.

TITOLO DELLE AGGLUTININE RISCONTRATO SETTIMANALMENTE
NEL SIERO DEI CONIGLI VACCINATI

Trattamento	Coniglio N.	Titolo delle agglutinine Settimane dopo la vaccinazione				
		1	2	3	4	5
Vaccinati tre volte con sospensione batterica trattata con formalina.	1	150	600	400	300	100
	2	200	800	600	600	300
	3	100	600	600	400	100
Vaccinati una sola volta con vaccino precipitato.	4	600	1.600	3.200	2.400	2.400
	5	1.200	1.200	3.200	3.200	1.600
	6	600	800	1.200	2.400	1.600

Come risulta dalla tabella II, il titolo di agglutinine nel siero degli animali vaccinati una sola volta col vaccino precipitato è molto più alto di quello dei conigli vaccinati tre volte con la sospensione batterica uccisa con la formalina. Negli animali vaccinati con la sospensione in formalina una settimana dopo l'ultima vaccinazione, il titolo di agglutinine è ancora relativamente basso, dopo la seconda settimana raggiunge il massimo, e nella terza settimana in due dei tre conigli il titolo mostra tendenza a diminuire, tendenza che continua pure nella quarta settimana. Il titolo di agglutinine degli animali vaccinati coll'antigeno precipitato è già sin dalla prima settimana molto più alto in confronto al gruppo già menzionato, nella seconda settimana, il titolo continua ad aumentare e nella terza settimana raggiunge in genere il valore massimo e anche nella quarta settimana soltanto un coniglio su tre comincia a diminuire, mentre in un altro resta invariato e nel terzo aumenta ancora. I risultati suddetti dimostrano l'effetto del deposito di antigene. L'antigeno introdotto col precipitato resta a lungo al punto di inoculazione e liberandosi lentamente causa un permanente stimolo all'immunizzazione che si manifesta nel più elevato titolo di agglutinine e nella sua più lunga durata.

Immunizzazione attiva. — Quindici giorni dopo l'ultima vaccinazione ho infettato le cavie per via intraperitoneale con vibrioni del colera. La virulenza del ceppo usato (ceppo El Korein) è stata aumentata con ripetuti passaggi negli animali. Ho eseguito l'iniezione con la sospensione batterica ottenuta direttamente da culture ricavate dal sangue del cuore di cavie morte di colera. Ho fatto cioè, una semina col sangue del cuore in un tubo di agar, ed ho ripreso la cultura di 24 ore con 4 cm³ di soluzione fisiologica. In genere 0,15 cm³ di questa soluzione uccideva la cavia in 24 ore. Ho infettato gli animali con 0,5 cm³, ossia con una dose più volte letale. Il risultato di queste prove è dimostrato nella tabella III.

TABELLA III.

RISULTATO DELL'INFEZIONE PRATICATA 15 GIORNI DOPO
LA VACCINAZIONE

Vaccinati tre volte con sospensione con formalina	Vaccinati una volta con vaccino precipitato	Controlli
7/3	7/5	4/0

Nella tabella il numeratore indica il numero degli animali infettati, mentre il denominatore indica il numero degli animali sopravvissuti alla infezione. Tutti i controlli infettati sono morti. Dei 7 animali vaccinati tre volte con la sospensione batterica ne sono morti 4, mentre dei 7 vaccinati col vaccino precipitato ne sono morti 2. Questi esperimenti dimostrano che il vaccino precipitato assicura agli animali una difesa maggiore che la sospensione di colera uccisa con la formalina.

Immunizzazione passiva. — Dai conigli trattati col vaccino precipitato (numeri 4-5-6) della tabella n. II, ho fatto un salasso dopo tre settimane. Ho mescolato il siero dei tre animali e l'ho inoculato a cavie. La prima dose è stata di $1,0 \text{ cm}^3$ per via sottocutanea dopo 8 ore, 2 cm^3 per via intraperitoneale e dopo 16 ore 2 cm^3 per via sottocutanea. Dopo tre ore ho infettato 4 animali trattati e 3 controlli, come nelle prove di immunizzazione attiva. I controlli sono morti tutti in 24 ore, mentre gli animali trattati con siero sono rimasti tutti vivi. Il siero dei conigli trattati col vaccino precipitato è dunque capace di difendere le cavie dall'infezione mortale del colera.

B) *Vaccino misto contro il tifo, paratifo A, paratifo B, colera.* — Ho vaccinato i conigli col vaccino precipitato preparato come più sopra si è detto. Anche in questo caso ho fatto ricerche parallele con un vaccino generalmente usato, il quale contiene in un cm^3 , un miliardo di B. tifo, 7,5 milioni di B. paratifo A. 7,5 milioni di B. paratifo B. e 5 miliardi di V. di colera. I germi sono stati uccisi con formalina 0,5%.

Reazioni postvaccinali. — Come nell'esame del vaccino anticolerico così anche per il vaccino misto ho ricercato negli animali vaccinati le reazioni locali e generali, ma nè la sospensione formalinizzata, nè il precipitato, hanno causato manifestazioni patologiche negli animali vaccinati.

Produzione di agglutinine. — Ho esaminato le agglutinine per il B. tifo «O», «H», per il B. paratifo A, per il B. paratifo B, e per il V. colera con lo stesso metodo usato nel caso del vaccino anticolerico. Per l'esame delle agglutinine «O» ho fatto bollire la sospensione di bacilli del tifo per $1/2$ ora; per le agglutinine «H», ho aggiunto alla sospensione di bacilli del tifo vivi 0,5% di formalina. Per l'esame delle agglutinine del paratifo A, paratifo B e colera ho utilizzato la sospensione relativa ai germi vivi. Non ho esaminato le agglutinine del tifo

TABELLA IV.

Vaccinati tre volte con sospensione con formalina						Vaccinati una volta con vaccino precipitato						
Coniglio N.	Tempo ultima vac- cinazione	Titolo di agglutinine				Coniglio N.	Tempo dalla vacci- nazione	Titolo di agglutinine				
		Tifo "O"	Tifo "H"	Paratifo A	Paratifo B			Colera	Tifo "O"	Tifo "H"	Paratifo A	Paratifo B
7	1 ^a Settim.	50	100	400	50	11	1 ^a Settim.	150	400	400	200	800
	2 ^a »	100	100	800	100		2 ^a »	200	400	600	600	2.400
	3 ^a »	100	200	800	150		3 ^a »	200	1.000	600	600	3.200
	4 ^a »	50	100	600	100		4 ^a »	200	800	800	400	3.200
	5 ^a »	50	50	200	50		5 ^a »	150	800	600	300	1.600
8	1 ^a Settim.	100	50	800	100	12	1 ^a Settim.	300	600	600	200	1.200
	2 ^a »	150	150	1.200	150		2 ^a »	300	600	1.600	300	1.600
	3 ^a »	100	200	800	300		3 ^a »	600	1.200	2.400	400	3.200
	4 ^a »	50	150	400	100		4 ^a »	400	1.200	1.600	600	2.400
	5 ^a »	50	100	100	50		5 ^a »	200	800	1.200	400	2.400
9	1 ^a Settim.	50	50	100	50	13	1 ^a Settim.	150	400	600	200	1.200
	2 ^a »	150	150	300	150		2 ^a »	600	800	1.200	400	2.400
	3 ^a »	150	150	300	150		3 ^a »	600	1.200	1.200	600	2.400
	4 ^a »	150	100	200	50		4 ^a »	400	1.200	800	400	1.600
	5 ^a »	100	100	100	50		5 ^a »	300	800	800	300	1.600
10	1 ^a Settim.	50	100	150	150	14	1 ^a Settim.	150	200	400	200	800
	2 ^a »	150	150	1.600	300		2 ^a »	400	800	400	600	1.600
	3 ^a »	100	150	800	200		3 ^a »	400	1.200	600	600	1.600
	4 ^a »	100	150	600	200		4 ^a »	600	800	800	600	1.600
	5 ^a »	50	100	200	50		5 ^a »	400	800	400	400	1.200

Vi, perchè è noto che per poter dimostrare le agglutinine Vi nel sangue dei conigli, è necessario inoculare una grande quantità di antigene per via endovenosa, e d'altra parte le ricerche Lovickovich e Rauss hanno dimostrato che il vaccino antitifico precipitato inoculato nell'uomo provoca una produzione considerevole di agglutinine Vi. Ho prelevato settimanalmente sangue dai conigli vaccinati, e ne ho determinato il titolo agglutinante del siero: i risultati sono riassunti nella tabella numero iv.

Dalla tabella risulta che le agglutinine «O» ed «H» per il B. del tifo sono più elevate negli animali trattati col vaccino precipitato, che in quelli trattati con la sospensione formalizzata. Inoltre negli animali trattati con la sospensione formalizzata è molto basso il titolo specialmente di tifo «O», una settimana dopo l'ultima vaccinazione; due settimane dopo raggiunge il valore più alto e già nella terza settimana comincia a diminuire e continua a diminuire nella quarta e nella quinta settimana. Il titolo di agglutinine degli animali trattati col vaccino precipitato è relativamente alto nella prima settimana, aumenta nella seconda e nella terza raggiunge il culmine.

Ancora nella quarta settimana mostra di stabilizzarsi, e solo nella quinta settimana comincia a diminuire lentamente. Nella produzione di agglutinine contro il paratifo A, non si osserva grande differenza tra i due gruppi di animali, però anche in questo caso in quelli trattati col vaccino precipitato la diminuzione del titolo comincia più tardi ed è più lenta. Il paragone nel caso del paratifo B, dà gli stessi risultati che il tifo. La differenza maggiore si osserva nella produzione di agglutinine contro il colera. Il titolo di agglutinine specifiche, usando la sospensione formalizzata, una settimana dopo l'ultima vaccinazione è molto basso, nella seconda si eleva improvvisamente; nella terza settimana comincia a diminuire lentamente e nella quarta e quinta settimana diminuisce precipitosamente. Invece il titolo di agglutinine per il colera nel siero dei conigli trattati col vaccino precipitato è più pronunciato e sotto ogni altro riguardo si comporta come le agglutinine per il tifo e paratifo. Siccome nel vaccino, l'antigene del colera è presente in maggiore quantità, si deve attribuire probabilmente a ciò, che il titolo di agglutinine specifico prodotto sia il più alto. Il fatto che il titolo di agglutinine nel siero degli animali trattati col vaccino precipitato è più elevato e diminuisce più gradatamente di quello del siero degli animali trattati colla

sospensione di batteri uccisi, si spiega coll'effetto del deposito di antigene che si risolve lentamente e produce uno stimolo di antigene perenne e duraturo nell'organismo.

Non ho fatto esperimenti di infezioni su animali con questo vaccino perchè Lovickovich e Rauss hanno dimostrato ormai incontestabilmente che il vaccino antitifico precipitato è molto adatto all'immunizzazione attiva; d'altra parte è molto difficile trovare animali sensibili all'infezione con bacilli di paratifo, mentre i risultati delle ricerche sopra riferite a proposito del vaccino anticolerico semplice dimostrano che il vaccino protegge contro l'infezione colerica.

Riassumendo le ricerche eseguite con i due vaccini di cui mi sono occupato, risulta che con una sola inoculazione del vaccino precipitato si raggiungono migliori risultati, che con la triplice somministrazione della sospensione di batteri uccisi con formalina. L'inoculazione dei vaccini non ha causato alcuna reazione patologica. Nel siero degli animali trattati col vaccino precipitato, la produzione delle agglutinine comincia più presto, raggiunge un titolo più alto e diminuisce molto più lentamente che negli animali vaccinati con la sospensione di batteri uccisi con formalina. L'inoculazione del vaccino precipitato anticolerico ha difeso gli animali contro l'infezione più volte letale, più efficacemente della sospensione batterica formalizzata. Il siero dei conigli trattati col vaccino precipitato inoculato nelle cavie ha procurato una immunità passiva di grado tale alla susseguente inoculazione di vibroni colerigeni in dose sicuramente letale, gli animali hanno resistito e sono sopravvissuti.

Mediante le ricerche eseguite col vaccino anticolerico, quanto con quello misto di tifo, paratifi, e colera sono stati confermati i principi enumerati nell'introduzione; le suddette ricerche dunque confermano e completano la serie degli esperimenti praticati da altri autori con vaccini precipitati.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di batteriologia. 15 luglio 1948.
