

Immunità e vaccini anticolerici in relazione al problema sanitario della prevenzione del colera in Italia

CLELIA COLLOTTI, LUCIANO VELLA e GIUSEPPE VICARI

Laboratori di Microbiologia e Laboratori di Chimica Biologica

Diffusione della attuale pandemia di colera

Dopo la sesta pandemia di colera degli anni venti, sembrava che questa malattia si fosse ritirata definitivamente nei suoi luoghi di origine e precisamente nel delta dei fiumi Gange e Brahmaputra, dove si era conservata per secoli allo stato endemico.

Un focolaio endemico di una sindrome similcolerosa si era verificato negli anni 1937-1938 nell'isola di Sulawesi (Celebes) in Indonesia (DE MOOR, 1939). Questa sindrome venne denominata «paracolera» e mantenne negli anni successivi un andamento endemico e stagionale, tranne alcuni episodi occasionali di diffusione a Giacarta e a Singapore (FELSENFELD, 1963).

Nel 1961 questo focolaio endemico di paracolera diede luogo a quella che negli anni successivi sarebbe diventata la settima pandemia colerica. In tale anno infatti il paracolera perse il suo andamento stagionale a Sulawesi e nello stesso tempo si diffuse ad altre isole dell'arcipelago Indonesiano, a Macao, Hong Kong e nelle Filippine, forse anche in Cina. Non appena ci si rese conto che l'epidemia non era dovuta al *Vibrio cholerae* biotipo classico, ma bensì al biotipo El Tor di Sulawesi (DE MOOR, 1963), l'Organizzazione Mondiale della Sanità organizzò nel Maggio 1962 una riunione straordinaria del «Committee on International Quarantine», nella quale venne presa la decisione che i casi di colera da biotipo El Tor venissero considerati con la stessa attenzione dei casi di colera da *V. cholerae* classico.

Negli anni successivi la pandemia continuò a diffondersi; nel maggio 1962 raggiunse il Giappone e nel 1963 la Corea; nel 1965-66 il *V. cholerae* classico venne quasi completamente rimpiazzato dal biotipo El Tor anche in India, rimanendo il biotipo classico dominante solo nel Pakistan orientale.

Nel 1969 si è avuta un'ulteriore accentuazione della diffusione verso il Laos e nuovamente a Hong Kong e in Corea. Infine nel 1970 la pandemia si è diffusa nell'area del Mediterraneo Orientale, interessando, oltre ai paesi del Medio Oriente, anche alcune nazioni europee quali l'URSS e la Cecoslovacchia e diverse nazioni africane tra cui l'Egitto, la Libia e la Tunisia, raggiungendo anche la costa atlantica dell'Africa (CHRONIQUE O.M.S., 1971). La storia della pandemia colerica nel 1971 è una storia recente appresa in

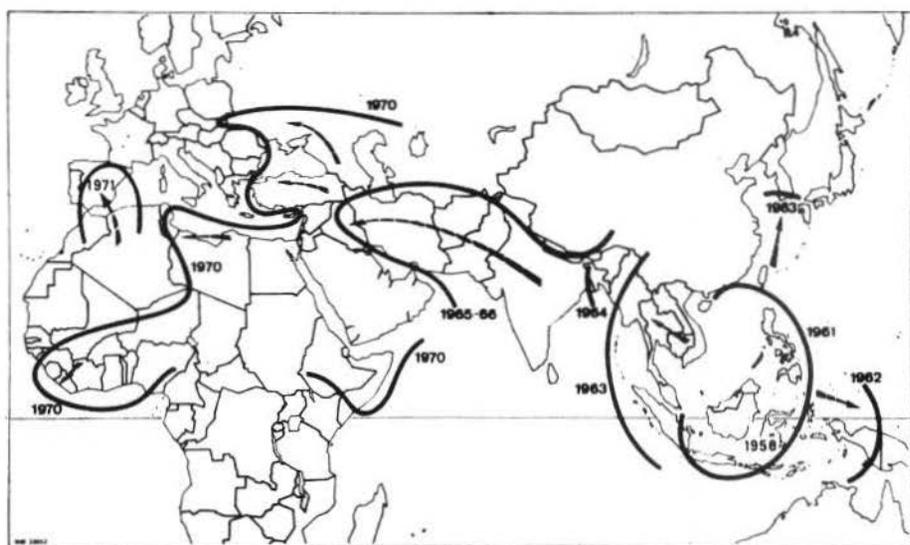


Fig. 1. — Diffusione del colera dal 1958 al 1971 (da CHRONIQUE O.M.S., 1971, modificata).

gran parte dalla stampa quotidiana e la nota più saliente sembra essere la ulteriore diffusione all'Europa attraverso il Marocco e la Spagna. In pratica l'Italia si trova attualmente ad essere minacciata dalla pandemia sia da Oriente che da Occidente (Fig. 1).

Il problema del colera per l'Amministrazione sanitaria italiana

La reazione dell'Amministrazione sanitaria italiana all'attuale pandemia di colera è stata una reazione che possiamo definire «torpida». Le cause di ciò vanno prevalentemente ricercate nell'eccessiva burocratizzazione dei suoi organi centrali, Ministero della Sanità e Istituto Superiore di Sanità, i quali hanno seguito la politica di trattare i mali sanitari del paese solo in senso curativo e non preventivo, il che, sia dal punto di vista scientifico che da quello di Sanità pubblica, è del tutto errato. Un esempio di tale

politica nel passato è quello della poliomielite, malattia per la quale l'introduzione del vaccino orale attenuato ha subito il ritardo di anni, con gravi ripercussioni sulla morbilità e sulla mortalità da poliomielite.

Tornando all'esempio recente del colera, che esistesse un tale problema anche per l'Italia venne segnalato dall'O.M.S. alla nostra Amministrazione sanitaria nel 1965 con la proposta di inviare un microbiologo al « Regional Training Course on Cholera » che si sarebbe tenuto, sempre sotto gli auspici dell'O.M.S., ad Ankara nel Febbraio 1966 (WORLD HEALTH ORGAN. REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, 1966). A tale seminario partecipò in effetti uno di noi (G.V.) e le proposte di provvedimenti, consigliate dall'O.M.S. in tale sede, vennero trasmesse al Ministero della Sanità con l'invito ad una sollecita applicazione di diverse misure preventive e di controllo. Alcune di queste misure, quali ad es. un corso per i medici e per i laboratoristi provinciali, sono state messe in atto solo nel 1971, cioè con ben 5 anni di ritardo. Altre, quali la costituzione di un Comitato per le malattie enteriche, comprendente tra l'altro un batteriologo esperto in *Enterobacteriaceae*, un batteriologo esperto in microbiologia delle acque, un esperto in microbiologia alimentare, un immunologo e un ingegnere sanitario, non sono mai state messe in atto. Tra l'altro un tale comitato avrebbe potuto anche coordinare un piano di ricerche su alcuni problemi del colera (quali ad es. vaccini antitossici e controllo del vaccino antibatterico), che avrebbe permesso oggi all'Amministrazione sanitaria e all'Istituto di affrontare il problema del colera su basi meno empiriche.

Recentemente comunque l'Amministrazione sanitaria sembra essersi risvegliata e sono state messe in atto un certo numero di iniziative, tra le quali due corsi sul colera per il personale sanitario, di cui uno nazionale e l'altro internazionale, quest'ultimo tenuto purtroppo in epoca successiva a quello nazionale, per cui l'esperienza acquisita in quella sede non è stata trasmessa alla organizzazione sanitaria italiana periferica.

Il nostro interessamento ai problemi di immunologia ci ha indotti ad esporre qui di seguito alcune considerazioni sugli aspetti immunologici connessi con il problema di sanità pubblica della prevenzione del colera. È opportuno sottolineare che la nostra specifica competenza in questo campo ci impone di considerare soltanto gli aspetti immunologici, che rappresentano solo una componente del problema e non certo la più importante in questo momento di tendenza invasiva della malattia. Non vanno certamente sottovalutati gli altri aspetti, quali la diagnosi batteriologica, che è il primo mezzo di difesa della malattia se effettuata tempestivamente, soprattutto in periodo invasivo, il controllo igienico delle acque e degli alimenti e le misure chemioprolattiche e terapeutiche (FELSENFELD, 1965; WORLD HEALTH ORGAN., 1970).

Immunità e vaccini nel colera

Nel colera gli organismi patogeni si moltiplicano prevalentemente nel lume intestinale ma non attraversano la parete intestinale e non invadono quindi tutto l'organismo. Gli effetti sull'ospite sono prodotti sia per mezzo della moltiplicazione locale dei vibrioni, sia per mezzo delle sostanze tossiche da essi elaborate all'interno dell'intestino sulla mucosa intestinale e con tutta probabilità nei tessuti immediatamente sottostanti alla mucosa.

È ragionevole quindi supporre che se i vibrioni non riuscissero a moltiplicarsi e ad elaborare delle tossine non si avrebbero i sintomi clinici del colera.

In effetti vengono prodotti anticorpi sia contro i componenti somatici del vibrione sia contro i suoi prodotti tossici. Possiamo dunque distinguere nel colera una immunità antibatterica ed una immunità antitossica, e di conseguenza sono stati sviluppati sia dei vaccini antibatterici, che sono quelli maggiormente in uso, sia dei vaccini antitossici, che sono tuttora allo stadio sperimentale o poco più.

I primi vaccini anticolerici vennero realizzati negli ultimi anni del 1800 e nei primi anni di questo secolo ad opera specialmente di HAFKINE (1892; 1895; 1911; 1913), che ideò un vaccino a base di vibrioni viventi attenuati e di KOLLE (1894; 1896), che impiegò un vaccino ucciso al calore.

I vaccini attualmente in uso e largamente diffusi nei vari paesi sono vaccini morti e si possono distinguere essenzialmente in:

- a) vaccini anticolerici realizzati con il biotipo classico;
- b) vaccini anticolerici realizzati con il biotipo El Tor;
- c) vaccini anticolerici misti.

La maggior parte di questi vaccini è costituita da vibrioni uccisi al calore o con fenolo. Essi debbono contenere 8000 milioni di organismi per ml (4000 milioni di ciascun tipo sierologico Ogawa e Inaba).

Questi vaccini danno luogo allo sviluppo nel siero di anticorpi antibatterici agglutinanti e vibriocidi; soprattutto questi ultimi sono stati considerati responsabili della protezione.

Anticorpi antibatterici sono stati anche trovati nel liquido intestinale di soggetti affetti da colera e di animali infettati sperimentalmente. I coproanticorpi contro il vibrione del colera sono distribuiti in tutte e tre le classi molecolari di immunoglobuline, IgG, IgM e IgA. Alcuni AA. hanno cercato di stimolarne lo sviluppo mediante la somministrazione di vaccini orali (FRETER, 1962; BHATTACHARYA & MUKERJEE, 1968; BHATTACHARYA, NARAYANASWAMI & MUKERJEE, 1968).

Per quanto riguarda il numero delle dosi e la quantità di vibrioni per dose di vaccino, i dati della letteratura sono molto discordanti. Per quanto riguarda invece la durata dell'immunità, sono tutti d'accordo che dopo 3-4 mesi il livello di anticorpi cade e praticamente scompare entro un anno.

In conclusione l'opinione più accettata è che questi vaccini antibatterici, sebbene di dubbia efficacia (vedi sotto), debbano continuare ad essere impiegati (CHRONIQUE O.M.S., 1969), secondo le modalità consigliate dall'O.M.S., fino a quando non si trovi qualcosa di meglio.

Il vibrione in coltura o nell'intestino produce molte sostanze tossiche. Ciò ha portato a una certa confusione nel concetto di « tossina colerica », in particolare per quanto si riferisce alla tossina responsabile della diarrea nel colera, per la quale in letteratura ricorrono numerose denominazioni: enterotossina, esoenterotossina, tossina dell'ansa iliaca, esotossina colerica, fattore di accumulo liquido, fattore di permeabilità e colerageno.

Una classificazione abbastanza convincente delle sostanze tossiche prodotte da *V. cholerae*, sulla base della loro stabilità al calore e della loro dializzabilità, nonché di altre proprietà, è stata proposta da BURROWS *et al.* nel 1965 e ribadita nel 1968 (Tab. 1). Il fattore tossico che oggi si ritiene il principale responsabile dell'accumulo di liquido nell'intestino appartiene al gruppo 2 di questa classificazione; si tratta di una proteina antigenica termolabile, non dializzabile, che apparentemente agisce sulla mucosa intestinale, determinando una secrezione attiva di liquido e di elettroliti nel lume intestinale (COLEMAN *et al.*, 1968).

TABELLA 1

Classificazione di Burrows (1968) delle tossine coleriche

Tipo	Sistemi di rivelazione	Preparazione				Termo- labile (a)	Dializza- bile
		WCL (b)	CW (c)	IC (d)	SUP (e)		
1	Mortalità nel topino	+	+	+	-	no	no
	Mortalità dell'embrione di pollo	+	+	+	-	no	no
2	Coniglio neonato	+	-	+	+	si	no
	Ansa ileale	+	-	+	+	si	no
	Cane	NP	NP	NP	+	NP	no
	Inoculazione intradermica	+	-	+	+	si	no
	Colture cellulari	+	-	+	+	si	no
3	Epitelio di Anuri	+	-	+	+	no	si
	Inibizione del consumo di p-aminoippurato	+	NP	NP	+	no	si

(a) A 56°C per 15 minuti; (b) Lisato totale; (c) Parete cellulare; (d) Intracellulare; (e) Sopranatante; NP: Non provato.

Un'altra tossina con le caratteristiche attribuite al gruppo 2, inoculata per via intradermica nel coniglio o nella cavia, determina un aumento della permeabilità dei capillari della pelle, che si manifesta con indurimento ed edema della zona di inoculazione (CRAIG, 1966): l'aumento della permea-

bilità vasale alle proteine sieriche si evidenzia molto bene inoculando endovena all'animale del blu di pontamina che legandosi all'albumina del siero la colora in blu, mettendo così in risalto la zona di edema.

Al gruppo 1 appartengono invece le sostanze « endotossiche » non dializzabili e termostabili, che vanno decisamente tenute distinte da quelle del gruppo 2. Esse infatti, dal punto di vista immunochimico, sono lipopolisaccaridi costituenti della parete cellulare, i cui zuccheri residui dell'estremo terminale non riducente costituiscono i determinanti antigenici responsabili della immunità antibatterica.

Una rassegna approfondita su quella componente della tossina colerica che è responsabile della diarrea (tossina di tipo 2 della classificazione di BURROWS) è stata pubblicata recentemente da PIERCE, GREENOUGH & CARPENTER (1971), che designano tale tossina con il nome di « enterotossina colerica ».

FINKELSTEIN & LO SPALLUTO (1969) e EVANS & RICHARDSON (1968) hanno messo a punto un metodo di produzione di questa tossina mediante colture del ceppo Inaba 569 B su un terreno relativamente semplice a base di casaminoacidi, saccarosio e sali. Sono state anche descritte modifiche del metodo (RICHARDSON, 1969; RICHARDSON & NOFTLE, 1970) nonché le opportune condizioni di pH e temperatura (KUSAMA & CRAIG, 1970; RICHARDSON, 1969).

I metodi di purificazione della enterotossina sono stati descritti da FINKELSTEIN & LO SPALLUTO (1970) e da RICHARDSON, EVANS & FEELEY (1970) e sono basati sulle comuni tecniche di purificazione delle proteine, quali precipitazione con solfato d'ammonio o solfato di destrano, gel-filtrazione e cromatografia su colonna. È interessante il fatto che FINKELSTEIN & LO SPALLUTO (1970) siano riusciti ad isolare contemporaneamente una seconda frazione costituita da una molecola più piccola della enterotossina colerica, identica a quest'ultima dal punto di vista antigenico ma priva di attività biologica. Essi considerano questa sostanza come un tossoide naturale e lo hanno denominato « coleragenoide ».

Una tecnica di purificazione della tossina colerica, realizzabile su base industriale e basata essenzialmente su adsorbimento su gel di alluminio e successiva eluzione, è stata descritta da SPYRIDES & FEELEY (1970).

La enterotossina colerica purificata contiene 85-92% di proteine, meno dell'1% di lipidi e non possiede carboidrati. Il peso molecolare si aggira tra 61.000 e 90.000. Il coefficiente di sedimentazione è 5,6 S per la tossina e 4,2 S per il coleragenoide.

Le proprietà principali della enterotossina colerica sono la termolabilità (a 56° C), la labilità agli acidi, la sensibilità alla pronasi (ma non alla tripsina) e infine il potere antigenico.

Studi fatti con la enterotossina purificata hanno portato ad attribuirle le seguenti proprietà:

1) introdotta nell'intestino induce un accumulo notevole di liquido, che si manifesta quasi subito e dura 14-18 ore; solo l'intestino tenue è interessato in questo processo; non sembra che l'enterotossina sia assorbita. La mucosa intestinale appare integra, sia al microscopio ottico che al microscopio elettronico.

Quanto al meccanismo di questa azione, sembra che il normale trasporto del sodio dalla mucosa alla sierosa sia abolito e che il trasporto attivo di cloruro, che normalmente avviene nel senso mucosa→sierosa, sia invertito; ne risulta un trasporto di acqua e di elettroliti nel lume intestinale;

2) inoculata sottocute nel coniglio e nella cavia provoca un aumento della permeabilità dei capillari alle proteine;

3) inoculata nel *foot pad* di ratto e di topo provoca un edema prolungato;

4) incubata *in vitro* in presenza di cellule grasse isolate di epididimo di ratto determina un aumento della lipolisi da parte di queste cellule.

La stimolazione della lipolisi è proporzionale al logaritmo della concentrazione di tossina ed è neutralizzata dall'antitossina, per cui questo sistema può essere facilmente adattato per la misura dell'attività dell'enterotossina e della corrispondente antitossina;

5) aumenta la glicogenolisi, sia *in vivo* che *in vitro*;

6) inoculata endovena nei cani provoca un aumento del livello sierico della fosfatasi alcalina di origine epatica.

Ma forse l'aspetto più importante di questo studio sta nel fatto che esso riferisce molti dati che suggeriscono un possibile meccanismo d'azione biochimicamente definito per l'enterotossina colerica. La sua azione sull'accumulo di liquido nell'intestino tenue è sovrapponibile a quella di agenti, quali la teofillina e le prostaglandine, capaci di alterare i livelli tissutali di adenosinmonofosfato ciclico, con la conseguenza di una inibizione dell'assorbimento attivo del sodio e di una stimolazione della secrezione attiva di cloruri nella mucosa di ileo di coniglio *in vitro*; *in vivo*, la teofillina e molte prostaglandine, infuse nell'arteria mesenterica di cane, inducono perdita di acqua e di elettroliti dall'intestino tenue; il contenuto in elettroliti del liquido intestinale, in questi casi, è analogo a quello indotto dall'enterotossina colerica.

L'analogia è rafforzata dal reperto che l'enterotossina colerica aumenta notevolmente l'attività adenilciclasica (l'enzima che determina la formazione dell'adenosinmonofosfato ciclico) delle cellule della mucosa intestinale (KIMBERG *et al.*, 1970). L'andamento nel tempo dell'aumento dell'attività adenilciclasica è analogo a quello della fuoriuscita di liquido in risposta all'enterotossina.

L'aumento della lipolisi da parte di cellule isolate di epididimo di ratto e l'aumento della glicogenolisi indotti dall'enterotossina possono anche spiegarsi con un tale meccanismo, essendo entrambi i fenomeni direttamente o indirettamente controllati dai livelli cellulari di adenilciclastasi.

Un'ultima osservazione di rilievo è che alcuni degli effetti della enterotossina colerica, in particolare l'azione sulla perdita di liquido attraverso l'intestino tenue, sono inibiti da sostanze chimiche (ac. etacrinico e cicloesimide) (CARPENTER, CURLIN & GREENOUGH, 1969; SEREBRO *et al.*, 1969). Indipendentemente dagli studi volti a migliorare i vaccini già esistenti e a realizzarne di nuovi, questa osservazione dovrebbe incoraggiare la ricerca di farmaci capaci di inibire o contrastare l'azione della enterotossina colerica.

Una volta purificata, la tossina colerica è stata utilizzata per la preparazione di una anatosina (UNGAR *et al.*, 1970). I dati a disposizione non sono ancora sufficienti per provare con certezza l'efficacia dell'immunità antitossica nella prevenzione della sintomatologia del colera nell'uomo. La presenza di anticorpi antitossici è stata dimostrata nella maggior parte dei soggetti affetti da colera dopo la prima settimana di malattia, nel siero di convalescenti, dove il titolo antitossico era ancora elevato fino a 12-18 mesi dopo l'infezione (PIERCE *et al.*, 1970), come pure in volontari umani inoculati con una dose di anatosina colerica semipurificata, seguita da due dosi della stessa anatosina adsorbita su fosfato di alluminio (UNGAR *et al.*, 1970). Finora, la maggior parte degli esperimenti sull'immunità antitossica sono stati eseguiti in animali ed una buona protezione è stata dimostrata nel cane (CURLIN *et al.*, 1970) e nel coniglio (BURROWS & MUSTEIKIS, 1966; FINKELSTEIN & ATTHASAMPUNNA, 1967; FEELEY & ROBERTS, 1969). Il livello di anticorpi ottenibile in questi animali è più alto dopo due dosi di anatosina che non dopo una sola dose, comunque anche l'immunità antitossica è di durata relativamente breve e dopo un anno dalla vaccinazione il titolo è circa 1/10 del massimo valore raggiunto.

Le principali linee di ricerca per lo sviluppo di nuovi vaccini anticolerici sono le seguenti:

1) *Vaccini anatossici* di cui si è già accennato sopra. Da tener presente la maggiore antigenicità della tossina formolata rispetto alla tossina nativa, riportata da più AA. (FEELEY & ROBERTS, 1969; CRAIG, 1967).

2) *Vaccini batterici purificati*. Un lipopolisaccaride purificato è stato preparato sia dal sierotipo classico Ogawa che dal sierotipo classico Inaba ad opera di WATANABE & VERWEY (1965). Questo lipopolisaccaride, oltre ad avere il vantaggio di non produrre reazioni aspecifiche, sembra in grado di produrre una buona immunità antibatterica (WATANABE & VERWEY, 1965).

3) *Vaccini in adiuvante*. Un vaccino incorporato in adiuvante oleoso è stato impiegato nelle Filippine, ma presenta lo svantaggio di dare reazioni locali troppo forti.

4) *Vaccini orali*. L'uso di tali vaccini è basato sull'idea di una loro maggiore efficacia rispetto ad un vaccino parenterale nello stimolare una risposta immunitaria locale nell'intestino. Sembrerebbe però che per una tale stimolazione siano necessarie dosi molte alte degli attuali vaccini batterici morti. Pertanto la ricerca in questo campo è diretta allo sviluppo di vaccini viventi avirulenti o attenuati.

Il problema della standardizzazione degli attuali vaccini anticolerici

I vaccini anticolerici a disposizione in Italia sono essenzialmente vaccini batterici costituiti da vibrioni uccisi. È noto come questo tipo di vaccino antibatterico provochi una risposta immunitaria efficace, la cui durata è però limitata ad un periodo di 3-6 mesi, solo in una certa percentuale di soggetti vaccinati. Recentemente si è visto che, pur rimanendo di durata limitata, una buona risposta anticorpale con corrispondente protezione dalla malattia può essere provocata nella quasi totalità dei soggetti vaccinati con vaccini appartenenti a lotti il cui controllo di efficacia era stato effettuato con opportune metodiche (WATANABE, 1971). In definitiva si può affermare, alla luce di questi risultati, che se il vaccino anticolerico viene prodotto in maniera tale da soddisfare determinati controlli, la probabilità che sia efficace in un grande numero dei soggetti vaccinati è piuttosto alta.

Il metodo di controllo del vaccino anticolerico richiesto sia dalla VII edizione della F.U. Italiana sia dalla O.M.S., è un metodo basato sulla valutazione della protezione di topini vaccinati, in confronto con quella di topini trattati con un vaccino di riferimento, rispetto all'azione di 1000 DL₅₀ di vibrioni virulenti (100 DL₅₀ nella F.U.I.) incorporate in un mezzo tamponato contenente mucina. La validità e la riproducibilità di un tale metodo sono legate essenzialmente a tre parametri e precisamente al ceppo di vibrione adoperato, al tipo di mucina e al ceppo di topini impiegati. I ceppi di vibrioni (Ogawa 41 e Inaba V86) debbono venir coltivati su terreni particolarmente ricchi (quali ad es. brodo di infuso di cuore, con l'aggiunta di opportuni supplementi) per un massimo di due passaggi e quindi di nuovo liofilizzati.

Non tutti i lotti di mucina favoriscono ugualmente bene la virulenza dei vibrioni e pertanto è necessario che ogni nuovo lotto prima di essere impiegato venga titolato in parallelo ad una mucina di riferimento che può essere richiesta al N.I.H. di Bethesda o all'Istituto di Sanità di Budapest, laboratori oggi all'avanguardia nel controllo dei vaccini anticolerici. Infine, non tutti i ceppi di topini sono ugualmente sensibili ai vibrioni colerici. Un ceppo di topini molto adatto è il ceppo CFW, adoperato nel N.I.H. di

Bethesda. Questo non esclude che altri ceppi possano essere ugualmente adatti, ma vanno provati. Se tutte le condizioni di cui sopra si verificano, la DL_{50} nel topino sarà di 5-10 cellule vitali di Ogawa 41 e di 0,5-2 cellule vitali di Inaba V86. Questi valori differiscono enormemente da quelli che si ottengono se non si rispettano le condizioni riferite e che possono essere di centinaia di migliaia di vibrioni. Se si considera che al momento del «challenge» questa dose va moltiplicata per mille, il rischio di uccidere il topino mediante intossicazione da endotossina e non con un meccanismo specifico è altissimo. In questi casi è ovvio che il controllo del vaccino non è valido.

Conclusioni e proposte

Da quanto sopra si può concludere che nella situazione attuale la prevenzione del colera mediante vaccini non sottoposti ad un controllo effettuato seguendo strettamente le regole sopraesposte non è certo il metodo migliore da impiegare. Se però questi vaccini antibatterici oggi a disposizione vengono sottoposti con esito favorevole al metodo di controllo di cui sopra, basato sull'impiego di ceppi di vibrioni, di tipi di mucina e di ceppi di topini appropriati, allora l'efficacia del vaccino è buona anche se limitata nel tempo e quindi automaticamente la vaccinazione di massa diventa un'arma potente per prevenire la malattia.

Di conseguenza è nostra opinione che l'Istituto debba prendere due provvedimenti immediati:

1) costituire un laboratorio per il controllo del vaccino anticolerico provvisto di servizi di lavanderia, sterilizzazione e stabulari autonomi. In tale laboratorio deve essere messo a punto il controllo secondo le regole sopraesposte;

2) costituire un gruppo di ricerca sui vaccini antitossici e sugli altri tipi di vaccini che possano essere sviluppati in futuro. Un tale gruppo sarebbe certamente svantaggiato all'inizio rispetto ad altri centri di ricerca sviluppati all'estero, come sempre avviene quando si arriva ultimi in un campo competitivo quale quello della ricerca medica. Tuttavia, il gruppo potrebbe avere come obiettivo immediato l'attività di aggiornamento sul problema, i contatti con esperti stranieri e la messa a punto dei metodi analitici e di standardizzazione degli eventuali nuovi vaccini realizzati altrove.

Ricevuto il 20 dicembre 1971.

BIBLIOGRAFIA

- BHATTACHARYA, P., A. NARAYANASWAMI & S. MUKERJEE, 1968. Production of antitoxic immunity by live oral cholera vaccine. *J. Bacteriol.*, **95**, 255.
- BHATTACHARYA, P. & S. MUKERJEE, 1968. Production of antibodies after live enteral cholera vaccination. *J. Infect. Diseases*, **118**, 271.
- BURROWS, W., G. M. MUSTEIKIS, N. B. OZA & N. K. DUTTA, 1965. Cholera toxins: quantitation and its relation to experimental enteric toxicity. *J. Infect. Diseases*, **115**, 1.
- BURROWS, W. & G. M. MUSTEIKIS, 1966. Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop. *J. Infect. Diseases*, **116**, 183.
- BURROWS, W., 1968. Cholera toxins. *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**, 245.
- CARPENTER, C. C. J., G. T. CURLIN & W. B. GREENOUGH, 1969. Response of canine Thiry-Vella jejunal loops to cholera exotoxin and its modification by ethacrynic acid. *J. Infect. Diseases*, **120**, 332.
- CHRONIQUE O.M.S., 1969. *L'immunologie du choléra*, **23**, 385.
- CHRONIQUE O.M.S., 1971. *La septième pandémie du choléra*, **25**, 171.
- COLEMAN, W. H., J. KAUR, M. E. IWERT, G. J. KASAI & W. BURROWS, 1968. Cholera toxins: purification and preliminary characterization of ileal loop reactive type 2 toxins. *J. Bacteriol.*, **96**, 1137.
- CRAIG, J. P., 1966. Preparation of the vascular permeability factor of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **92**, 793.
- CRAIG, J. P., 1967. Antigenicity of cholera toxoids. *Symposium on Cholera*, Palo Alto, Calif., July 26-28, p. 47.
- CURLIN, G. T., J. P. CRAIG, A. SUBONG & C.C.J. CARPENTER, 1970. Antitoxic immunity in experimental canine cholera. *J. Infect. Diseases*, **121**, 463.
- DE MOOR, C. E., 1939. Mededeelingen van den Dienst der Volksgezondeheid in Ned.-Indië. *Geneesk.*, *T. Ned.-Ind.*, **79**, 4034.
- DE MOOR, C. E., 1963. A non-haemolytic El Tor *Vibrio* as the cause of an outbreak of paracholera in West New Guinea (The El Tor problem and pandemic paracholera in the West Pacific). *Trop. Geogr. Med.*, **15**, 97.
- EVANS, D. J. JR., & S. H. RICHARDSON, 1968. In vitro production of cholera toxin and vascular permeability factor by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **96**, 126.
- FEELEY, J. C. & C. O. ROBERTS, 1969. Immunological responses of laboratory animals to cholera vaccines, toxin and toxoid. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **27** (Suppl.), 213.
- FELSENFELD, O., 1963. Some observations on the cholera (El Tor) epidemic, 1961-62. *Bull. World Health Organ.*, **28**, 289.
- FELSENFELD, O., 1965. Review of recent trends in research and control of cholera. *World Health Organ.*, Geneva.
- FINKELSTEIN, R. A. & P. ATTHASAMPUNNA, 1967. Immunity against experimental cholera. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **125**, 465.
- FINKELSTEIN, R. A. & J. J. LO SPALLUTO, 1969. Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinoid. *J. Exptl. Med.*, **130**, 185.
- FINKELSTEIN, R. A. & J. J. LO SPALLUTO, 1970. Production of highly purified cholera toxin and cholera toxinoid. *J. Infect. Diseases*, **121**, (Suppl.), S 63.
- FRETER, R., 1962. Detection of coproantibody and its formation after parenteral and oral immunization of human volunteers. *J. Infect. Diseases*, **111**, 37.

- HAFFKINE, W. M., 1892; 1895; 1911; 1913. Citato in: WILSON G. S. & A. A. MILES, *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, Edward Arnold, Ed., London, 1964.
- KIMBERG, D. V., M. FIELD, J. JOHNSON, A. HENDERSON & I. GERSHAW, 1970. Stimulation of intestinal mucosal adenylcyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. *J. Clin. Invest.*, **50**, 1218.
- KOLLE, W., 1894; 1896. Citato in: WILSON G. S. & A. A. MILES, *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, Edward Arnold, Ed., London, 1964.
- KUSAMA, H. & J. P. CRAIG, 1970. Production of biologically active substances by two strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, **1**, 80.
- PIERCE, N. F., J. G. BANWELL, R. B. SACK, R. C. MITRA & A. MONDAL, 1970. Magnitude and duration of antitoxic response to human infection with *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Diseases*, **121** (Suppl.), S 31.
- PIERCE, N. F., W. B. GREENOUGH III & C. C. J. CARPENTER JR., 1971. *Vibrio cholerae* enterotoxin and its mode of action. *Bacteriol. Rev.*, **35**, 1.
- RICHARDSON, S. H., 1969. Factors influencing in vitro skin permeability factor production by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **100**, 27.
- RICHARDSON, S. H., D. G. EVANS & J. C. FEELEY, 1970. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence. I. Purification and biochemical properties of PF/cholera enterotoxin. *Infect. Immun.*, **1**, 546.
- RICHARDSON, S. H. & K. A. NOFTLE, 1970. Purification and properties of permeability factor/cholera enterotoxin from complex and synthetic media. *J. Infect. Diseases*, **121** (Suppl.), S 73.
- SEREBRO, H. A., F. L. IBER, J. H. YARDLEY & T. R. HENDRIX, 1969. Inhibition of cholera toxin action in the rabbit by cycloheximide. *Gastroenterology*, **56**, 506.
- SPYRIDES, G. J. & J. C. FEELEY, 1970. Concentration and purification of cholera exotoxin by absorption on aluminum compound gels. *J. Infect. Diseases*, **121**, (Suppl.), S 596.
- UNGAR, J., M. STANIĆ, N. CHARITTE & S. J. VARALLYAY, 1970. Studies on cholera toxin and antitoxin. *J. Gen. Microbiol.*, **64**, 1.
- WATANABE, Y. & W. F. VERWEY, 1965. Protective antigens from El Tor vibrios. *Bull. World Health Organ.*, **32**, 809.
- WATANABE, Y., 1971, comunicazione personale.
- WORLD HEALTH ORGAN. REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. *Regional Training Course on Cholera*, Ankara 14-16, Feb. 1966.
- WORLD HEALTH ORGAN., *Principles and Practice of Cholera Control*, 40, Public Health Papers, Geneva, 1970.