

INCERCĂRI DE IMUNIZARE ACTIVĂ A ȘOARECILOR CONTRA INFECȚIEI TIFICE CU TULPINI DE AEROMONAS VII ȘI OMORÎTE PRIN CĂLDURĂ

L. Boér, Maria Akszenyuk, E. Kiss, G. Horváth, N. Kelemen

Intr-o lucrare anterioară (4) am arătat proprietățile biochimice, serologice și biologice (virulența, toxigenitatea) ale tulpinii de *Aeromonas* pe care am izolat-o din apă de băut.

În această lucrare arătăm experiențele noastre efectuate cu scopul de a cunoaște puterea imunogenă a tulpinii de *Aeromonas*, avînd structura antigenică identică — calitativ — cu aceea a tulpinii *S. typhosa*: Vi. 9—12. d. dar avînd o patogenitate mult scăzută față de șoareci albi.

Caracterizarea tulpinii (Pentru calcularea lui DL_{50} s-a utilizat formula lui Reed și Muench, 34).

I. **Virulența** (tulpina vie)

DL_{50} a tulpinilor a oscilat în anul 1961 între $1-1,5 \times 10^6$ germeni (inoculare i. peritoneală).

II. **Virulența** (tulpina vie) după 4 ani

DL_{50} a tulpinii, care s-a ales din subculturile cu integritate antigenică (Vi, 9—12, d) notată cu c_8 , a fost între $1,5-2 \times 10^8$ germeni, deci virulența inițială a scăzut de 100 de ori (ian.—febr. 1965).

I. a. **Toxicitatea** tulpinilor s-a determinat prin inactivarea suspensiilor, 2 ore la $58^\circ C$. Toxicitatea exprimată prin DL_{50} a fost în anul 1961 de 10^9 germeni (ian.—febr.).

II. a. În anul 1965 (ian.—febr.) tulpina aleasă spre experimentare a prezentat o toxicitate de 10^{10} germeni (DL_{50}).

Infecția de probă (pt. imunogeneză) s-a executat cu o tulpină de *S. typhosa* cu antigenitate completă (Vi. 9—12, d) izolată la I.S.I.P.M. dintr-un caz de îmbolnăvire recentă. Testarea imunogenității s-a făcut cu 3 DCL (Toate dozele s-au administrat în 0,2—0,4 ml suspensie. DCL s-a calculat după formula lui Reed și Muench, 34).

Datele morfologice, biochimice și serologice referitoare la tulpina vaccinată sînt trecute în lucrarea amintită anterior (4).

La 22. V. 1965 **virulența** a scăzut la 10^{11} germeni (DL_{50}).

I. Prima serie de imunizări executate de noi este cuprinsă în tabelele nr. 1 și 2 (vezi anexă). Interpretarea acestor experiențe o vom da în capitolul discuțiilor.

II. **Testarea imunogenității unui vaccin viu, preparat din tulpinile de *Aeromonas* notate cu e_4 , e_6 și e_7**

Culturi de 24 de ore pe agar înclinat sînt spălate cu ser fiziologic, executîndu-se diluția acestor suspensii pînă la densitatea de 10^9 germeni pe ml suspensie, amestecîndu-se părți egale din cele 3 suspensii ($e_4 + e_6 + e_7$); această suspensie se administrează în modul următor: se fac diluții, cantitățile inoculate fiind calculate pe cite 0,5 ml de suspensie fiecare.

Seria A (șoareci albi adolescenți)

9 șoareci se inoculează cu 0,5 ml suspensie de *Aeromonas* i. peritoneal, suspensia fiind tratată în prealabil, la temperatura de $58^\circ C$, timp de 2 ore (5×10^9 germeni).

Seria B

9 șoareci se inoculează i. peritoneal cu 0,5 ml suspensie (5×10^9 germeni) de *Aeromonas* viu.

Seria E

36 de șoareci se inoculează subcutanat cu 0,5 ml suspensie diluată astfel, încât acest volum să cuprindă 68 milioane ($6,8 \times 10^7$) germeni vii de *Aeromonas*.

Se alege calea subcutanată, deoarece în prima serie de experiențe aceasta s-a dovedit mai eficace (vezi tabelul nr. 2).

Seria C (Controlul toxicității tulpinii de *S. typhosa* care va fi utilizată la proba de imunitate)

7 șoareci se inoculează cu 0,5 ml suspensie, conținând 2×10^8 bacili tifici omoriți la 58°C timp de 2 cre.

Seria D (Controlul virulenței aceleiași tulpini de *S. ty.* pentru testarea de DCL).

8 șoareci se inoculează cu câte 0,5 ml suspensie, conținând 2×10^8 bacili tifici vii.

Rezultatele se prezintă în tabelul nr. 3.

Testarea virulenței tulpinii de *S. typhosa*

Se pregătește o suspensie din tulpina de *S. ty.* omologată turbidimetric cu etalonul nostru (nr. III, tabelul nr. 5).

Din suspensia etalonată se fac diluții de: $1/2$, $1/25$ și $1/5$. Se inoculează din fiecare diluție câte 5 șoareci albi din viitorul lot experimental, inoculându-se din ultima diluție ($1/5$) două serii de câte cinci (doza conținută în 0,5 ml suspensie).

Rezultatul a fost următorul:

Tabelul nr. 1.

Seria anim.	Nr. anim.	Greutatea, sex anim.	Tulpina inocul.	Calea inocul.	Cantitatea ml	Nr. germeni
I 1	5	sub 20 gr. masc.	C ₇	i. per.	0,2 0,4 0,4	6×10^7 12×10^7 *) 12×10^7
I 2	5	sub 20 gr. masc.	C ₈	i. per.	"	"
I 3	5	peste 20 gr. masc.	C ₇	i. per.	"	"
I 4	5	peste 20 gr. masc.	C ₈	i. per.	"	"
I 5	5	peste 20 gr. fem.	C ₇	i. per.	"	"
I 6	5	peste 20 gr. fem.	C ₈	i. per.	"	"
II 1	10	sub 20 gr. masc.	C ₇	subcut.	"	"
II 2	10	sub 20 gr. masc.	C ₈	subcut.	"	"
II 3	5	peste 20 gr. masc.	C ₇	subcut.	"	"
II 4	5	peste 20 gr. masc.	C ₈	subcut.	"	"
II 5	5	peste 20 gr. fem.	C ₇	subcut.	"	"
II 6	5	peste 20 gr. fem.	C ₈	subcut.	"	"
Control						
III 1	20	sub 20 gr. masc.	—	—	—	—
III 2	20	peste 20 gr. masc.	—	—	—	—

*) $1,2 \times 10^8$

Concluziile testării virulenței tulpinii de *S. typhosa*

Rezultatele noastre, obținute cu ocazia determinării virulenței unei tulpini de *S. typhosa*, izolată în teren de către laboratorul I.S.I.P.M. și menținută în condiții artificiale pe medii: geloză înclinată și geloză înaltă semisolidă (0,5%) arată că virulența scade în ritm destul de rapid în condiții artificiale, astfel:

1. la data de 30. I. 1965 s-a constatat o valoare de $1,2 \times 10^8$ germeni pentru exprimarea a 3 DCL;

Tabelul nr. 2.
Imunogenitatea tulpinii noastre de Aeromonas

Data	Vaccinul preparat din tulpina		Nr. decese		Nr. decese		Nr. decese		Rămăși in		Rămăși in		%
	I 0,2 ml vaccin Viu (6X10 ⁷ germ.)	II 0,4 ml vaccin Viu (12X10 ⁷ germ.)	III 0,4 ml vaccin Viu (12X10 ⁷ germ.)	21-30 XII 1964	30.XII- 31.XII- 8.I.	9.I- 29.I.	30.I	1.2X10 ⁸ (3DCL) Sty.vie	1.III 1965	1.III 1965	după 4 săpt.	Supra- viețuire	
Soareci	calea inocul.		calea inocul.		calea inocul.		1965		calea i.perit.				
seria	buc.	i. perit.		i. perit.		i. perit.		1965		calea i.perit.			
I 1	5	i. perit.		i. perit.		i. perit.		1965		calea i.perit.			
I 2	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
I 3	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
I 4	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
I 5	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
I 6	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
II 1	10	subcut.		subcut.		subcut.		1965		calea i.perit.			
II 2	10	"		"		"		1965		calea i.perit.			
II 3	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
II 4	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
II 5	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
II 6	5	"		"		"		1965		calea i.perit.			
Total	70	i.p.+s.c.		i.p.+s.c.		i.p.+s.c.		1965		calea i.perit.			
Control													
III 1	20	-		-		-		1965		calea i.perit.			
III 2	20	-		-		-		1965		calea i.perit.			
Total	40	-		-		-		1965		calea i.perit.			

2. la data de 31. V. 1965 se constată pentru 3 DCL= 6×10^8 germeni (interval 4 luni);

3. la data de 15. VI. 1965, executându-se o nouă determinare, valoarea se constată a fi aproape egală, intervalul fiind de numai 15—17 zile de la ultima determinare.

Tabelul nr. 3. sintetizează experimentele noastre de imunizare executate cu vaccinul viu și omorît de *Aeromonas*, tulpina mixtă: $e_4 + e_6 + e_7$.

Tabelul nr. 4.

Testarea virulenței tulp. de *S. ty.*: 15. VI. 1965.

Nr. șoareci	5	5	6	5	
Doza de <i>S. ty.</i>	$1(2 \times 10^8)$	$2(0,8 \times 10^8)$	$3(1,6 \times 10^8)$	$4(0,8 \times 10^8)$	Observ.
Data	Animale rămase în viață				
15.VI. dim.	5	5	6	5	la inoculare
16.VI. dim.	2	5	2	3	după 24 ore
16.VI. amiază	1	3	1	2	după 30 ore
17.VI. dim.	1	3	Ø	2	după 48 ore
Indice:	<DCL	<DL ₅₀	DCL	>DL ₅₀	

* DCL este dată în coloanele 1 și 3, iar DL₅₀ rezultă din coloanele 2 și 4.

Tabelul nr. 5.

Titrrile indicate de tuburile turbidimetrice
(Turbidimetrie)

Nr. crt.	Nr. tubului turbidimetr.	Titrrul suspensiei comparate	Citirea
1.	00	10^{11} Enterobacterii ml	pe fond negru
2.	0	10^{10} ..	pe fond negru
3.	I.	10^9 ..	pe fond negru
4.	II.	$6,8 \cdot 10^8$..	pe fond negru
5.	III.	4×10^8 ..	pe fond negru
6.	IV.	$2,7 \cdot 10^8$..	pe fond negru
7.	V.	$1,36 \cdot 10^8$..	pe fond negru
8.	VI.	$6,8 \times 10^7$..	pe fond negru

Discutarea rezultatelor și concluzii

Literatura de specialitate este bogată în studii publicate în domeniul vaccinării contra febrei tifoide și a febrelor paratifice. În bibliografia noastră prezentăm numai cele mai importante publicații care au apărut în țara noastră în ultimii ani (2, 3, 6, 7, 12, 25, 26, 28, 29, 30, 35, 38). Autorii străini utilizează pe scară largă vaccinurile chimice (1, 8, 13, 14, 15, 24, 37), iar recent și protoplastii formați fizico-chimic (10, 11).

În publicațiile și comunicările noastre și noi am abordat în ultimii 15 ani această problemă (3, 4, 5, 5'a), arătând rezultatele favorabile obținute cu

vaccinul antitific adsorbit (corpuscular precipitat) și recomandând introducerea vaccinului peroral (1951) experimentat cu succes de I. Cantacuzino și colab. încă în anul 1927. Recent G. Fanconi a recomandat asemenea vaccini (12).

În anul 1951 nu a fost acceptată propunerea formulată de noi (3) însă în planul M.S.P.S. referitor la anul 1966 apar ambele vaccinuri ca metode oficiale pe țară.

Vaccinarea cu microbi vii atenuați este o problemă cunoscută pe care am expus-o pe larg într-o lucrare recentă (5). Istrati Gh. și colab., ocupându-se în ultimii ani cu vaccinarea antidizenterică, consacră vaccinului viu mai multe lucrări (16. 17. 18 19. 20, 21, 22, 23). Exemplul vaccinului viu antipoliomielitic a dat un avânt puternic unor asemenea cercetări (36).

Vaccinurile de grupă și paravaccinurile îi preocupă pe autorii indigeni dovedind valoarea lor în experiențe pe animale (25, 26, 35).

Scopul nostru în experiențele arătate a fost, ca în locul unui vaccin omcrit (TAB) să introducem o metodă de para-vaccinare cu un vaccin viu, cu specia de *Aeromonas* din Familia Pseudomonadaceae — contra unei infecții cu *S. typhosa* din familia Enterobacteriaceae.

Rezultatele cercetărilor noastre ne-au îndreptățit, ca locul speciei noastre să-l stabilim în familia Enterobacteriaceae, având structura antigenică de *S. typhosa*. Nu putem accepta atitudinea lui Edwards și Ewing (1962) care exclud o astfel de specie din familia Enterobacteriaceae pentru că are o activitate de pectinază și de citocrom-oxidază (4). În astfel de condițiuni nici nu mai putem vorbi de para-imunitate, ci numai de o imunitate de grupă. Bacteria vaccinantă (*Aeromonas*) aparținând aceleiași familii bacteriene, ca agentul patogen contra căruia se îndreaptă imunizarea (*S. typhosa*).

Materialul experimental a fost sintetizat în tabelele 1—5.

Din acest material se constată cele ce urmează:

1. Din tabelul 1—2 reiese că atât în seria experimentală, cât și în cea de control, s-a constatat o mortalitate ridicată mai mare în seria de control (III. 2): examenul bacteriologic a pus în evidență un streptococ hemolitic cu colonii mucoase, probabil *Streptococcus zooepidemicus* (gr. C) (32) activat prin șocul antigenic eterolog.

2. Inocularea i. peritoneală cu 3 doze repetate de *S. typhosa* și *Aeromonas* în doze subletale a dat o protecție de 100% față de infecția tifică (tabel nr. 2).

3. Inoculată pe cale intraperitoneală într-o singură doză de $5 \cdot 10^6$ germeni, tulpina *Aeromonas*, atît în stare vie, cât și omorîtă prin căldură (2 ore la 58°C), asigură o protecție de 66.6% a șoarecilor albi față de 3 DCL de *S. typhosa* (tabelul nr. 3).

4. O doză de 2×10^8 de *S. typhosa*, omorîtă la 58°C timp de 2 ore, inoculată i. perit. la șoareci albi, asigură o protecție de 85.7% față de 3 DCL din aceeași tulpină de bacil tific (tabelul nr. 3).

5. Cea mai bună protecție (100%) a fost obținută prin 3 inoculări subcutanate de *Aeromonas* viu (vezi tabelul nr. 2).

6. Calea i. peritoneală — deși asigură de asemenea o protecție masivă, fiind repetată de 3 ori — este mai periculoasă prin provocarea unui șoc antigenic, precum s-a văzut în tabelul nr. 2.

7. Inocularea unei singure doze de *Aeromonas* viu ($6.8 \cdot 10^7$) pe cale subcutanată asigură o protecție de 50% față de 3 DCL de *S. typhosa* (tabelul nr. 3).

8. Tulpina de *S. typhosa*, care se utilizează în proba protecției active, trebuie testată totdeauna cu 2—3 zile înainte de probă, avînd în vedere variabilitatea mare a bacteriilor păstrate în culturi.

În astfel de condiții proba protecției active a șoarecilor este o metodă bună pentru controlul imunogenității vaccinurilor antitifice (tabelele nr. 4—5)

Puterea imunogenă și patogenitatea scăzută a tulpinii *Aeromonas* izolată de noi fiind stabilite, experiențe în continuare sînt menite să stabilească dozele optime.

În alte serii de experiențe vom trece la imunizarea perorală a unor animale sterile (aseptice); în prezent se lucrează în vederea asigurării condițiilor de întreținere ale animalelor sterile (9. 27. 33).

Sîntem convinși că administrarea perorală a unui vaccin viu, preparat din tulpini nepatogene, este metoda viitorului în vaccinarea contra infecțiilor tifice.

Sosit la redacție: 30 septembrie 1965.

Bibliografie

1. ALEXANDROV N. I și colab.: JMEI (1961), 11, 66; 2. ANGELESCU I. și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Micr. (1963), 22/3, 821; 3. BOËR L., VAJNA G.: Rev. Med. (1956), 1, 19; 4. BOËR L.: Izolarea din apă de băut a unei tulpini bacteriene din genul *Aeromonas* (specie neîntilnită încă), avînd structura antigenică a *S. typhosa* (Vi. 9—12. d). (Comunicare la USSM Tg.-Mureș la data de 25. sept. 1965); 5. BOËR L.: Metodele noastre de imunizare contra infecțiilor enterale (fecal-orale). Bazele teoretice ale imunității celulare, antibacteriene și antivirale. (Comunicare la USSM Tg.-Mureș la data de 25. X. 1964); 5.a BOËR L.: Infecțiile alimentare (1963) (Colecție de lucrări în 581 pagini manuscris); 6. CHIRESCU M., RÎMNICEANU I.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/1, 261; 7. COMBIESCU D., CORNELIA COMBIESCU, I. VLĂDOIANU: Stud. cerc. inframicro-parazitol. (1956), 7, 1—2, 131; 8. COOPER C. N., A. E. STUART: Nature (1961), 191, 4785 294; 9. DAMIN G. și colab.: J. Bact. (1961), 82, 284; 10. DIENA B. B. et alii: Canad. J. Microbiol. (1964) 10 4, 543; 11. DIENA B. B. et alii: Canad. J. Microbiol. (Ref. în Excerpta Medica. Sect. IV. (1965), 3, 346; 12. FANCONI G.: Stud. cerc. inframicrobiol. (1962), XIII/5, 581; 13. HAIFET L. B. și colab.: JMEI (1958), 10, 44; 14. HAIFET L. B.: JMEI (1961), 9, 18; 15. HAIFET L. B. și colab.: JMEI (1962), 7, 53; 16. ISTRATE GH. MEITERT T.: Microbiologia (București) (1961), 3, 231; 17. ISTRATE GH., MARIA ISTRATE: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 24 1, 87; 18. ISTRATE GH., MARIA ISTRATE: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/3, 721; 19. ISTRATE GH. și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1963), 22/3, 531; 20. ISTRATE GH., MARIA ISTRATE: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23 1, 91; 21. ISTRATE GH. și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/1, 141; 22. ISTRATE GH., și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/2, 281; 23. ISTRATE GH., MARIA ISTRATE: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/2, 289; 24. LUXEMBURG K. I.: J.M.E.I. (1961), 4, 108; 25. MINTZER LÉONIE: Arch. Roum. Path. exp. (1959), 18/4, 585; 26. MINTZER LÉONIE, ZILISTEANU EUGENIA: Microbiol. (Buc.) (1961), 2, 135; 27. MORECINOV I. N., JAGUD S. L., BARSTEIN JU. A.: J.M.E.I. (1963), 1, 40; 28. NESTORESCU N. și colab.: (10): Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1963), 22,3 523; 29. NESTORESCU N. și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/2, 417; 30. NESTORESCU N. și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/2, 363; 31. OLITZKI A. L., GODNIGER D.: Boll. Ist. seiroter. milan 47, 5—6, 213; (Ref. Microbiol. Buc. 1965, 3, 210); 32. POP A. și colab.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23/1, 123; 33. POP A.: Arch. Roum. Path. exp. Microbiol. (1964), 23 2, 423; 34. REED L. I., MUENCH H.: Am. J. Hyg. (1938), 27, 493. (Cit. SINKOVICS J.: Die Grundlagen der Virusforschung Verl. Ungar. Akad. (1956), 346. Pentru calcularea I. DL₅₀); 35. SCHAFLER S., MINTZER L., BENEȘ S.: J.M.E.I. (1957), 8, 8; 36. SPÎNU I. și colab.: Stud. cerc. inframicrobiol. (1962), XIII/5, 593; 37. TULLY (Joseph G.) (Julius A.) CURRIE: J. Bact. (1962), 84, 4, 742; 38. VLĂDOIANU I. B., DIMACHE C.: Microbiologie, Buc. (1965) 10, 2, 97.