

I vaccini, come sono nati e chi ha contribuito al loro sviluppo e alla loro formulazione

UNA PROSPETTIVA STORICA: L'ICONOGRAFIA CLASSICA OVVERO LA VACCINAZIONE DI JENNER CONTRO IL VAIOLO



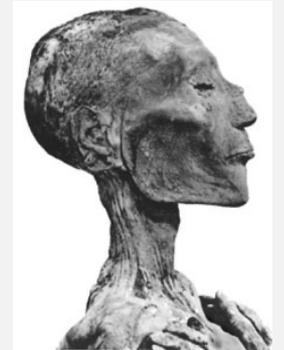
English engraving by James Gillray, 1802

Vaiolo

- Causato dal virus del vaiolo (famiglia dei Orthopoxvirus, genere Poxviridae). Il virus penetra attraverso i polmoni e viene trasportato attraverso il circolo sanguigno alla pelle e agli organi interni. La mortalità va dal 10 al 30%

Nei casi lievi la malattia lascia solo cicatrici, nei casi gravi provoca emorragie interne, infezioni secondarie e morte. Non esiste trattamento. E' stato causa di grandi epidemie. La prima di cui si ha notizia è relativa al 1350 in Egitto.

- Il vaiolo è stato oggetto di un programma di vaccinazione globale conclusosi nel 1972 in cui la malattia è stata dichiarata debellata.



Il primo vaccino contro il vaiolo

"*The Genius of China: 3000 Years of Science, Discoveries and Inventions*", Simon and Schuster, New York, by Robert Temple, 1986

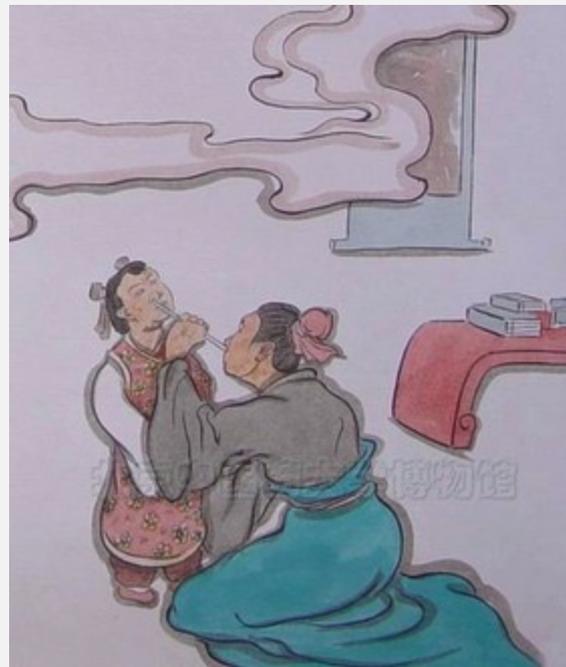
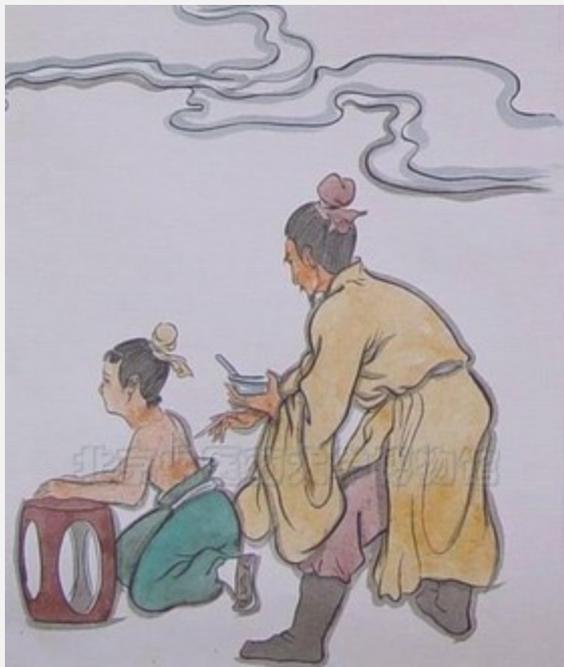
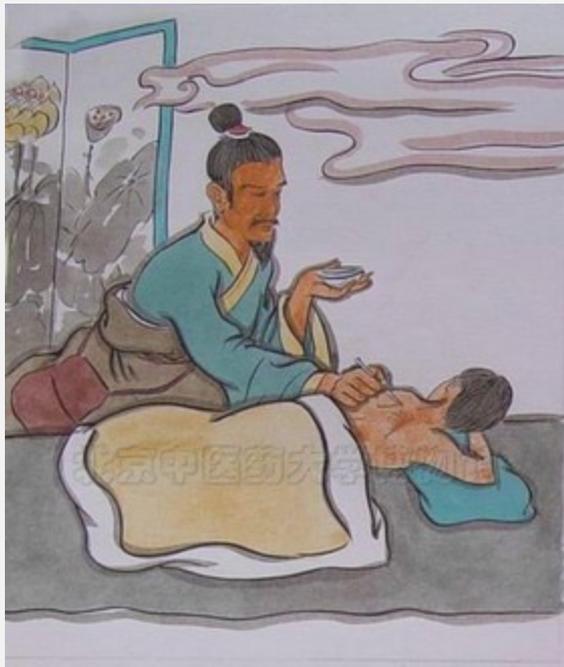
- Le origini della prima inoculazione delle pustole del vaiolo in individui sani sono misteriose in Cina.
- La tecnica sembra originata nella provincia del Sud dello **Sichuan**. Nella regione a Sud-Ovest di questa provincia c'è una montagna nota come **O-Mei Shan** che è associata al Buddismo ed il Taoismo. I sacerdoti Taoisti che vivevano nelle caverne di questa montagna custodivano il segreto della inoculazione delle pustole di vaiolo già all'epoca del decimo secolo DC.



Nel Sud-Ovest la tecnica divenne popolare quando il figlio maggiore del Primo Ministro Wang Tan (957-1017) morì di vaiolo. Wang si adoperò affinché tale sorte non colpisse gli altri membri della sua famiglia e a tale scopo convocò medici, stregoni e religiosi per trovare un rimedio. Un eremita Taoista venuto dal monte O-Mei Shan, descritto come un medico dell'anima devoto alla religione, introdusse per primo ufficialmente in Cina la tecnica della vaccinazione.

Sempre in Cina...

- Durante la dinastia Song (960-1279), i Cinesi usavano la procedura "**Yi Miao**": la terapia prevedeva di indossare i guanti delle persone morte di vaiolo.
- “Inoculation against smallpox in China” divenne popolare e praticata verso gli anni 1567-72. Ne viene data una descrizione nel libro di Yu Chang *Miscellaneous Ideas in Medicine*, of 1643.
- Durante la dinastia Ming (1368-1644) era in uso la “Variolation” con varie tecniche: l’inserzione di materiale dalle piaghe di ammalati sotto la pelle di individui sani; l’insufflamento di materiale essiccato dalle piaghe dei malati nelle narici di individui sani attraverso un tubo di argento (“Gan Miao”: vaccino secco) ; l’uso di un impasto di questo materiale con l’acqua da introdurre nel naso degli individui sani (“Shi Miao”: vaccino umido).



Vaccinazione contro il vaiolo in Europa

- Durante il diciassettesimo secolo la tecnica della vaccinazione venne introdotta lentamente dalla Cina in Europa attraverso il traffico di mercanti della “via della Seta” e una volta diffusasi in Turchia attirò l’attenzione degli Europei.
- Il mercante inglese John Lister riportò questa metodologia in Inghilterra alla Royal Society nel 1700.
- La moglie dell’ambasciatore inglese a Costantinopoli (Istanbul), Lady Mary Wortley Montagu (1689-1762) consentì che la sua famiglia fosse 'variolated' nel 1718.

MARIA TERESA GIAVERI

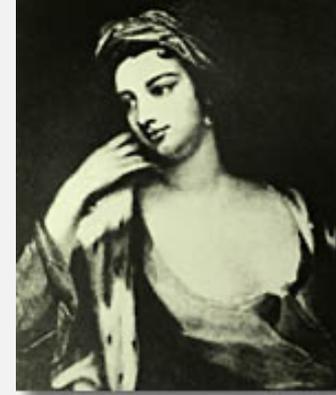
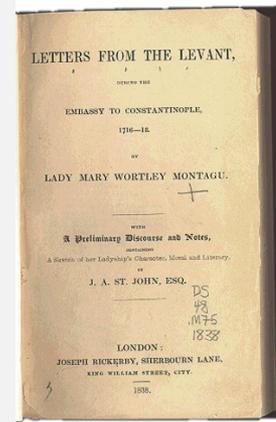
**LADY MONTAGU
E IL DRAGOMANNO**

VIAGGIO AVVENTUROSO
ALLE ORIGINI DEI VACCINI



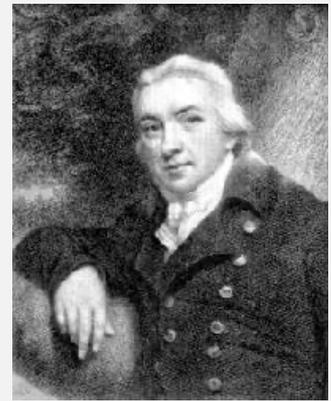
LADY MARY WORTLEY MONTAGU (1689-1762)

Nel Dicembre 1715 fu colpita dal vaiolo che la lasciò senza sopracciglia e con una pelle butterata



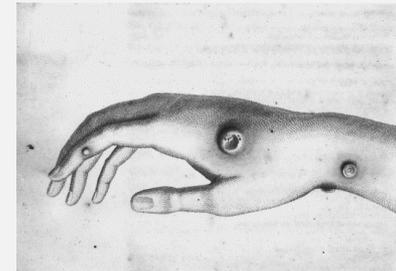
- Lady Mary era la moglie dell’Ambasciatore Inglese in Turchia (1716-1718). Imparò la tecnica della “variolazione” in Turchia e vaccinò suo figlio nel 1717 e sua figlia in Inghilterra nel 1721.
- Sebbene ci fosse una ovvia resistenza a questa vaccinazione in Inghilterra e Lady Mary fosse duramente criticata dall’ Alta Società inglese, nel 1772 ottenne di vaccinare i figli del principe e della principessa di Galles. Questo episodio validò la diffusione di questo metodo in Inghilterra ed in Europa.
- Nella seconda metà del diciottesimo secolo, l’ Europa fu sottoposta a varie epidemie di vaiolo. In questo periodo nell’Inghilterra rurale si diffuse il concetto che le donne addette alla mungitura delle vacche da latte erano spesso risparmiata dalla forma clinica del vaiolo e su questa osservazione fu fatta la connessione fra la malattia che colpiva i vitelli “cowpox” ed il vaiolo nell’uomo.

Edward Jenner



E.J. Nasce il 17 maggio 1749, in Berkeley, Gloucestershire, Inghilterra e muore il 26 gennaio 1823.

- **Mentre da giovane studiava per divenire medico ascoltò una conversazione di una giovane fattora che asseriva che essendosi ammalata di “cowpox” non si sarebbe ammalata di vaiolo. Questo fu l’inizio dell’elaborazione della strategia vaccinale.**
- **Dopo anni di sperimentazione il 14 Maggio del 1796, Edward Jenner condusse il famoso esperimento con il piccolo James Phipps di 8 anni al quale inoculo il cowpox. Jenner prelevò il materiale dalla pustola sul braccio di Sarah Nelmes una contadina che era apparentemente malata di cowpox. Il materiale prelevato fu poi inoculato al bambino. Deliberatamente due mesi dopo E.J. espose il piccolo James Phipps al virus del vaiolo dimostrando che il bambino era protetto dalla forma clinica della malattia. Era presente solo una leggera infiammazione intorno all’area dove era stato inoculato il virus.**
- **Alcuni scritti riportano che nel 1789 E.J. avesse sperimentato il vaccino sul proprio figlio, all’epoca di un anno e mezzo, usando il swin-pox il virus del vaiolo dei suini seguito dalla somministrazione di quello del vaiolo!!!!**



La mano di Sarah Nelmes

- **Nel 1798 E.J. Scrisse un lavoro scientifico descrivendo questo primo caso di vaccinazione per la rivista "Transactions of the Royal Society of London". Il suo studio non fu compreso ed anche in occasione di una sua visita a Londra nessuno gli dette fiducia. Scoraggiato E.J. Ritornò a Berkeley.**

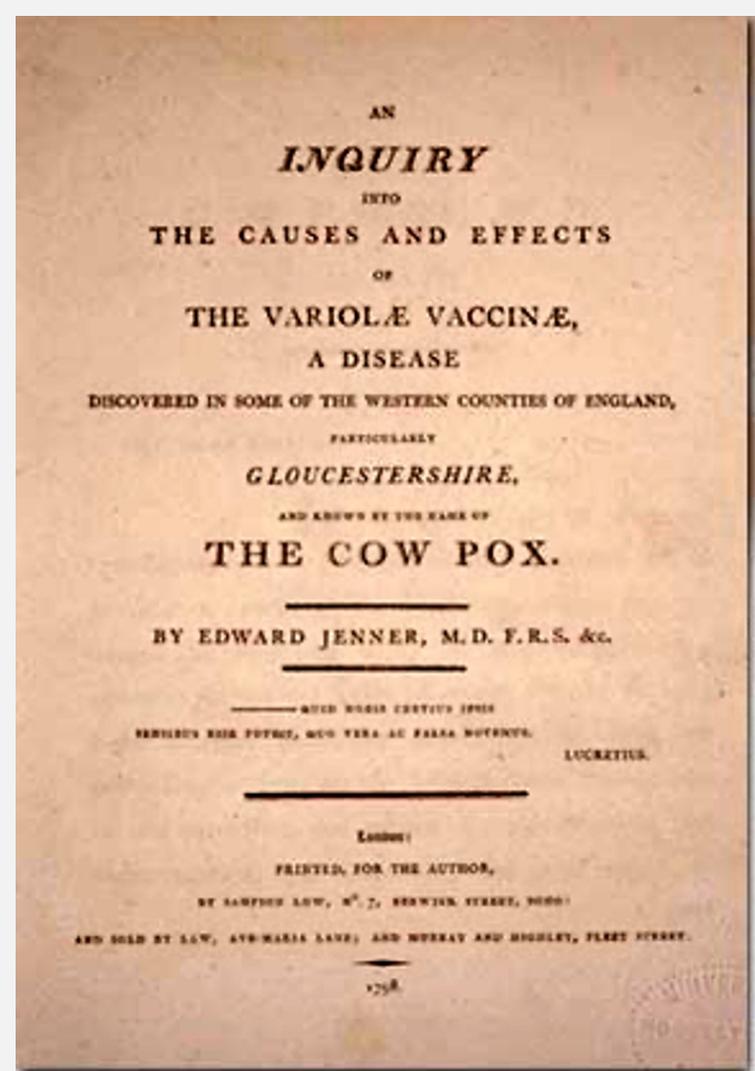


Nel 1801, Jenner pubblicò "The Origin of the Vaccine Inoculation" descrivendo come il materiale proveniente dal vaiolo dei bovini fosse preparato per inocularlo alle persone sane in un'ottica vaccinale contro il vaiolo ("vaccinate"). In seguito il materiale usato proveniva dalle braccia di bambini vaccinati. I bambini erano quindi costretti a viaggiare per l'Europa per fornire il materiale per la vaccinazione. A tale scopo venivano spesso usati gli orfani. Dal 1840, il governo Inglese ha proibito qualsiasi altro trattamento preventivo contro il vaiolo.

"Vaccination," il termine coniato da Jenner per definire il suo trattamento (dal latino, *vacca*), fu adottato da Louis Pasteur per le immunizzazioni contro ogni malattia infettiva.



**An
Inquiry
into
the causes and effects
of the Variolae Vaccinae,
a disease discovered in some of the
western counties of England, particularly
Gloucestershire,
and known by the name of
the cow-pox**



Baxby D. 1999. Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. *Vaccine*. 1999 Jan 28;17(4):301-7.

L'odierno vaccino contro il vaiolo

E' basato su di un virus attenuato

Viene prodotto da culture cellulari di fibroblasti.

Fornisce protezione per circa 10 anni. Tuttavia non esistono dati "quantitativi" sull'immunità fornita da questo vaccino

Metodo di somministrazione: un ago a due punte, a forma di forchetta per incidere la pelle della parte superiore del braccio.

Adverse reaction rate: 250 per milione (0.025%)





La rivoluzione di Pasteur ovvero il concetto di attenuazione

“..il caso favorisce le menti preparate..”

- Nell'estate del 1881 L. Pasteur andò in vacanza lasciando sul bancone di laboratorio una coltura dell'agente eziologico del colera dei polli che oggi sappiamo essere *Pasteurella multocida*. Al suo ritorno, in autunno, la coltura venne inoculata nei polli e non diede origine al colera. Pasteur osservò, poi, che se questi stessi polli venivano infettati con colture fresche di *P.multocida* questi animali non sviluppavano la malattia. Comprese quindi che quella coltura “invecchiata” sul bancone di laboratorio aveva reso i polli immuni dalla malattia. Aveva creato, senza cercarlo, **il primo vaccino attenuato**.
- Sulla base di questa esperienza Pasteur comprese che i patogeni potevano essere attenuati se sottoposti a stress ambientali, quali l'esposizione ad alte temperature, all'ossigeno ed il trattamento con prodotti chimici.



- Nel 1881 Pasteur annunciò la sua teoria sulla vaccinazione suscitando numerose perplessità.
- Su questo tema fu sfidato da un veterinario famoso a quell'epoca H. Rossignol che sfidò Pasteur a dimostrare pubblicamente la sua idea nella sua fattoria a Poully-Le-Fort.
- Pasteur raccolse la sfida insieme ai suoi colleghi Emile Roux e Charles Chamberlain.

- Nel maggio di quello stesso anno 25 pecore venivano “vaccinate” 2 volte nell'ambito di 2 settimane con l'agente infettivo dell'antrace (*Bacillus anthracis*) “attenuato”, cioè mantenuto a 42° per 2 settimane. Altre 25 non ricevevano il vaccino.
- Alla fine di maggio entrambi i gruppi di animali furono infettati con un ceppo altamente virulento di *B. anthracis*. Dopo due giorni un comitato composto da fattori, veterinari, farmacisti e funzionari del Governo osservarono i risultati che furono quelli attesi: le pecore vaccinate erano protette dall'antrace e le altre 25 morirono. Il vaccino fu subito diffuso e nel **1882, 79000** pecore furono già vaccinate contro l'antrace.

Il vaccino di Jaime Ferran

Il primo vaccino umano fu sperimentato nel **1884** da Jaime Ferran. Ferran iniettò per via parenterale brodoculture di *Vibrio cholerae* “attenuato”. All’epoca un’epidemia di colera si era abbattuta sulla Spagna. Circa 30 000 persone furono quindi vaccinate con questo vaccino.



Jaime Ferran (1854-1929)

- Sfortunatamente la cultura pare fosse contaminata da altri batteri e solo una piccola percentuale di microbi fosse rappresentata da *Vibrio*.
- Le persone vaccinate andarono incontro ad una serie di effetti collaterali. Una commissione internazionale sponsorizzata dall’Istituto Pasteur diede parere negativo riguardo all’uso di questo vaccino.

IL VACCINO DI WALDERMAR HAFFKINE



Waldermar Haffkine (1860-1930)

- Il vaccino fu ampiamente utilizzato in India e studi statistici successivi misero in luce la sua efficacia. L'uso di questo vaccino fu comunque abbandonato.

- Nel 1891 a Waldermar Haffkine all'Istituto Pasteur fu commissionato un nuovo vaccino contro il colera.
- Seguendo gli insegnamenti del suo maestro L. Pasteur sull'attenuazione W. Haffkine preparò due ceppi di *V. cholerae*: uno attenuato, in seguito alla coltivazione a 39° con aereazione, ed un altro ipervirulento dopo vari passaggi intraperitoneali nelle cavie.
- Entrambi i ceppi venivano usati sequenzialmente per le immunizzazioni parenterali. Dapprima veniva inoculato il ceppo attenuato e dopo 7 giorni quello ipervirulento. Ovviamente le persone vaccinate erano soggette a tutta una serie di effetti collaterali sia locali al sito dell'iniezione sia generalizzati.

WILHELM KOLLE E LA SCOPERTA DEI VACCINI INATTIVATI

WILHELM KOLLE



Hofaufograph B. H. Vogt, Frankfurt a. M.

W. Kolle

- Nel 1896 W. Kolle scoprì che *V.cholerae* inattivato dal calore poteva servire per le immunizzazioni parenterali nell' uomo.
- Questo vaccino era semplice da preparare e minimizzava gli inconvenienti osservati con quello di Haffkine. Il vaccino si conservava in una soluzione di fenolo allo 0,5%.
- Il vaccino di Kolle fu ampiamente usato durante l' epidemia del 1902 in Giappone.
- Studi sistematici condotti negli anni 60' e 70' in Bangladesh, nelle Filippine, in Indonesia ed in India misero in evidenza che il vaccino di Kolle conferiva immunità a breve termine sia nei bambini che negli adulti.

PFEIFFER E WRIGHT ED IL VACCINO CONTRO IL TIFO.



Richard Pfeiffer



Almorth Wright

- Nel 1896, indipendentemente, Richard Pfeiffer e Almorth Wright scoprirono che l' agente eziologico del tifo, *Salmonella typhi* poteva essere inattivata dal calore e conservata in presenza di fenolo.
 - A partire dal 1915 il vaccino contro il tifo formulato sulla base delle osservazioni di Pfeiffer e Wright, si diffuse negli eserciti in Europa e negli Stati Uniti.
-
- L' uso sistematico di questo vaccino nell' esercito USA determinò un decremento del 90% nell' incidenza di questa malattia
 - Teoricamente questo vaccino sembrava quindi altamente protettivo.
 - Tuttavia successivi studi epidemiologici fatti sotto il controllo dell' OMS negli anni 50' determinarono che l' efficacia di questo vaccino era solo del 50-60%.

ALBERT CALMETTE E CAMILLE GUERIN: IL MODERNO VACCINO CONTRO LA TUBERCOLOSI.

- Albert Calmette e Camille Guerin coltivarono *Mycobacterium bovis* l' agente eziologico della tubercolosi nei bovini, originariamente isolato nel 1902 da un vitello, per 13 anni effettuando 213 passaggi in coltura. Il bacillo che ne derivò, chiamato poi BCG, da Bacillus Calmette -Guérine, si rivelò essere avirulento nel modello della cavia, altamente suscettibile a questa infezione.
- Nel 1921 il BCG fu usato per la prima volta nell' uomo e venne dato per via orale ad un neonato la cui madre era morta per tubercolosi.
- Alla fine degli anni 20' circa 50 000 francesi erano stati vaccinati per via orale contro la tubercolosi mediante il BCG. Il vaccino si dimostrava ben tollerato.
- Negli anni 30' la vaccinazione intradermica soppiantò quella orale.
- Negli anni 50 studi epidemiologici confermarono l' efficacia del BCG.



Albert Calmette e Camille Guérin

La tubercolosi (2)

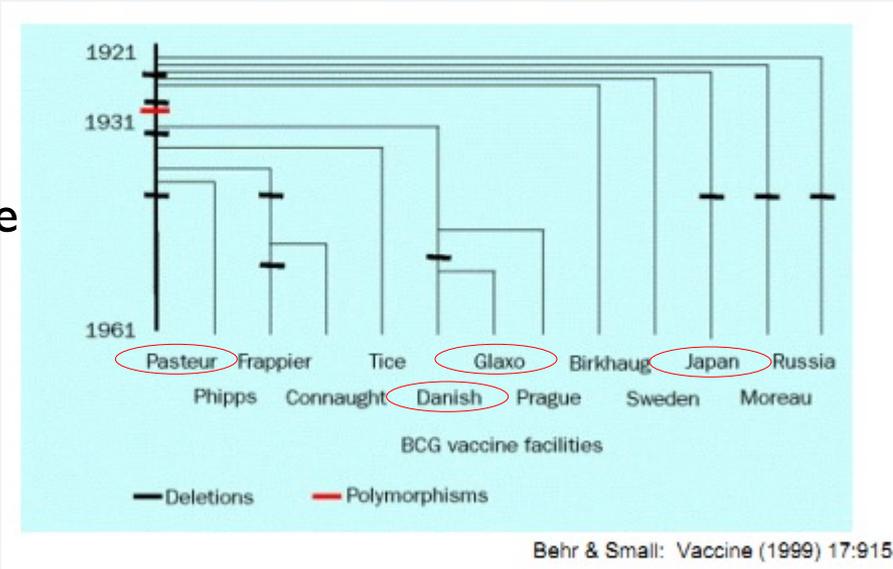
Il BCG oggi



Oggi circa 100 milioni di bambini vengono vaccinati ogni anno durante i primi mesi di vita

Il BCG si è evoluto nel tempo; oggi esistono ceppi vaccinali che divergono fenotipicamente e geneticamente

- Vaccino efficace nei bambini (10-15 anni).
- Previene l'infezione e le forme severe di TB (polmonare e disseminate)
- Inutile e/o nefaste in bambini HIV +



Necessità dello sviluppo di un nuovo vaccino

pre-esposizione / post-esposizione
Nuovo vaccino / prime-boost / rBCG

→ Vari vaccini in fase di trials clinici

is on track (Viet Nam).

FIG. 2.2

Countries (in blue) that had an estimated TB incidence rate of less than 10 per 100 000 population in 2019

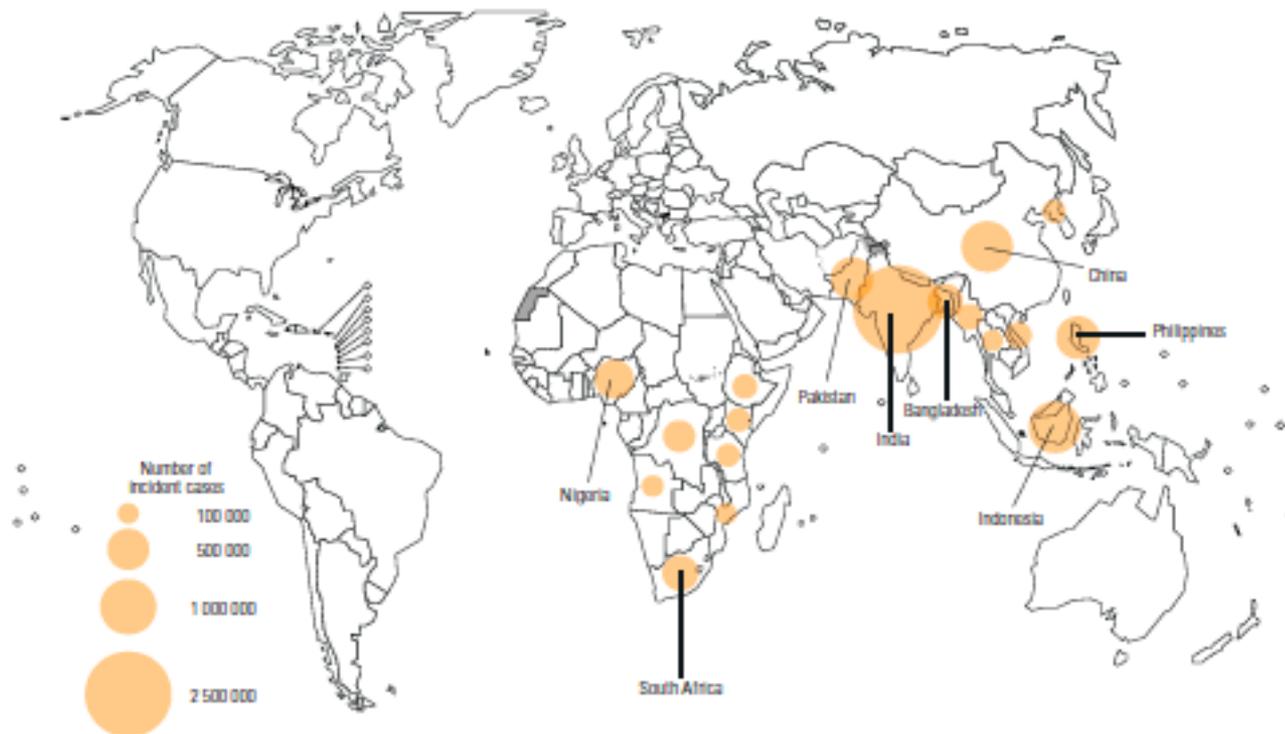


¹ When an HIV-positive person dies from TB, the underlying cause is coded as HIV in the International Classification of Diseases system.

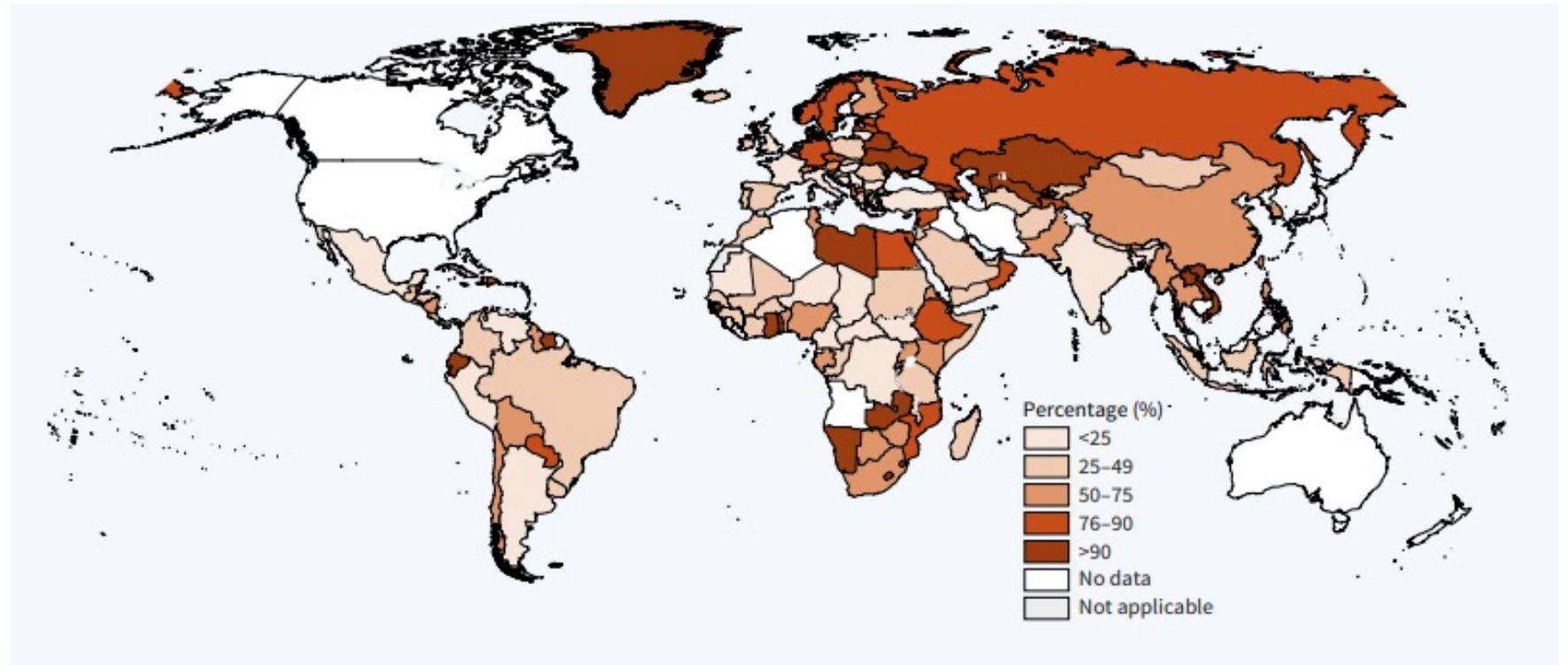
FIG. 2.3

Countries that had at least 100 000 incident cases of TB in 2019

The eight countries that rank first to eighth in terms of numbers of cases, and that accounted for two thirds of global cases in 2019, are labelled.



Percentage of people newly diagnosed with TB who were initially tested with a WHO-recommended rapid test at country level,^a 2021



^a Data are for notified cases.

Global trend in the estimated number of TB deaths, 2000–2019

The shaded areas are uncertainty intervals. Horizontal dashed lines mark the 2020 milestone and 2030 target of the End TB Strategy.

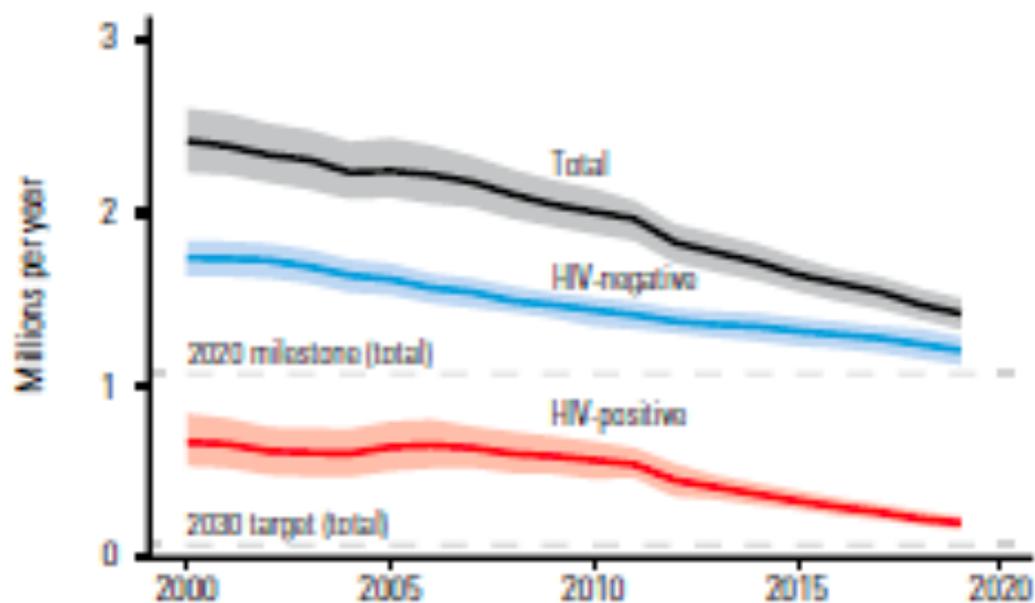
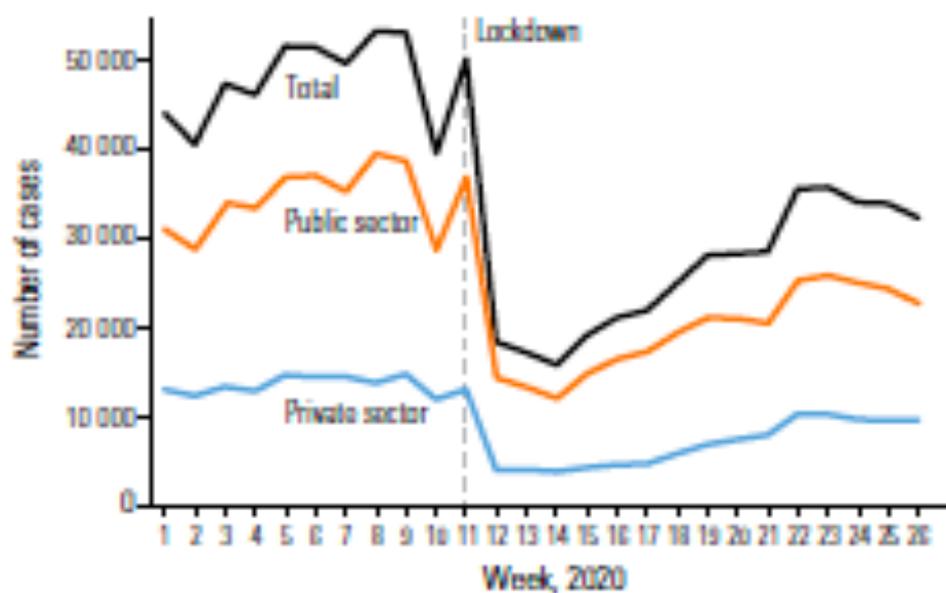


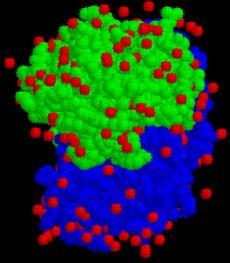
FIG. 3.2

Trends in weekly TB case notifications in India in 2020, before and after lockdown



Source: <https://reports.nikshay.in/Reports/TBNotification>, accessed 31 July 2020

I TOSSIODI COME VACCINI

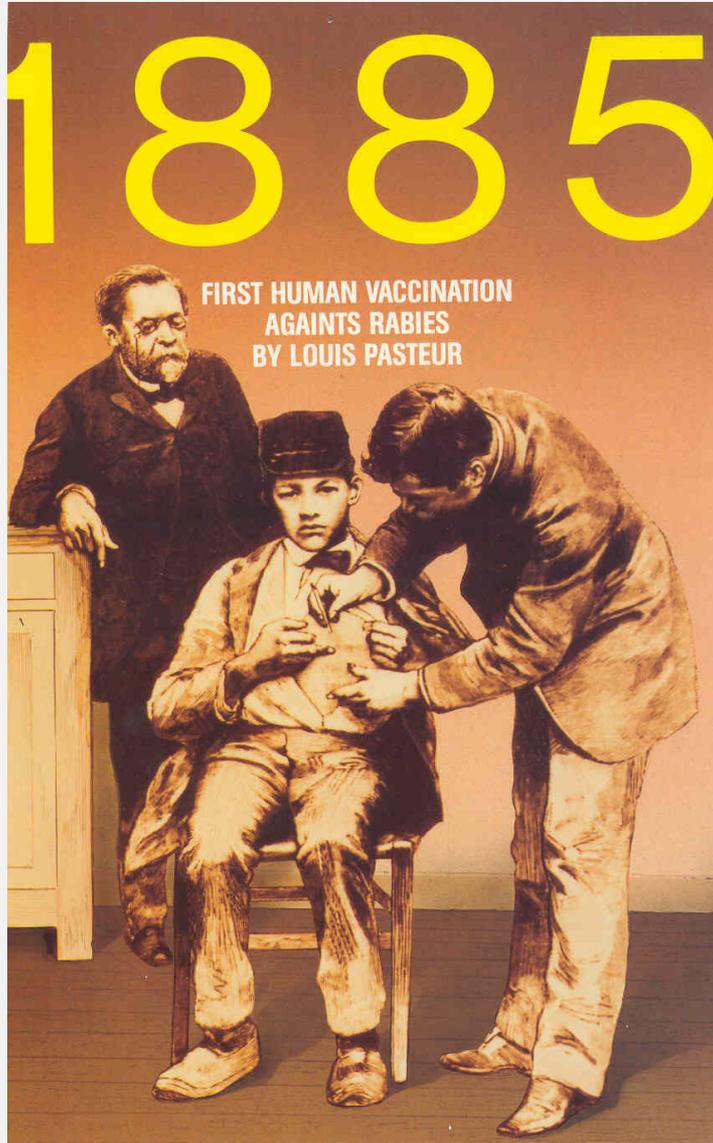


- Edwin Klebs e Frederick Loeffler diedero un contributo importante alla scoperta dell' agente eziologico della difterite mentre Shibasaburo Kitesato identificò l' agente eziologico del tetano.
- In breve tempo, usando i filtrati delle colture di *Corynebacterium diphtheriae* e *Clostridium tetani* furono identificate le relative tossine.
- Dalle tossine si arrivò alla formulazione di specifiche antitossine per la protezione passiva e di miscele di tossine/antitossine per la protezione attiva.
- Infine si scoprì che il trattamento con formalina delle tossine ne impediva l' azione tossica mantenendo la capacità immunostimolatoria.
- Nel 1905 Alexander Glenny individuò questo principio casualmente. Un lotto di tossina difterica era mantenuto in alcuni recipienti la cui sterilizzazione comportava un lavaggio in formalina. Glenny ipotizzò che questo step non fosse stato correttamente condotto e che i residui di formalina lasciati nei contenitori potessero essere stati sufficienti ad inattivare la tossina.

PASTEUR E LA RABBIA: IL PUNTO DI INIZIO PER I VACCINI VIRALI



- Pasteur comprese che l' agente eziologico della rabbia risiedeva nel cervello e nel midollo spinale degli animali infetti
- Si rese anche conto che questo agente non poteva essere coltivato come un batterio.
- Riuscì a riprodurre la malattia-la rabbia- iniettando estratti di cervello di animali infetti nei conigli. Con questo metodo attuò una coltura "in vivo" .
- Il suo allievo Roux osservò che il virus poteva essere inattivato lasciando essiccare il midollo spinale trattato con idrossido di potassio degli animali infetti durante 15 giorni.
- Su questa base Pasteur sviluppò un protocollo vaccinale che implicava l' inoculazione di materiale dal midollo spinale infetto per 14 giorni utilizzando via via materiale più "virulento" cioè meno essiccato.



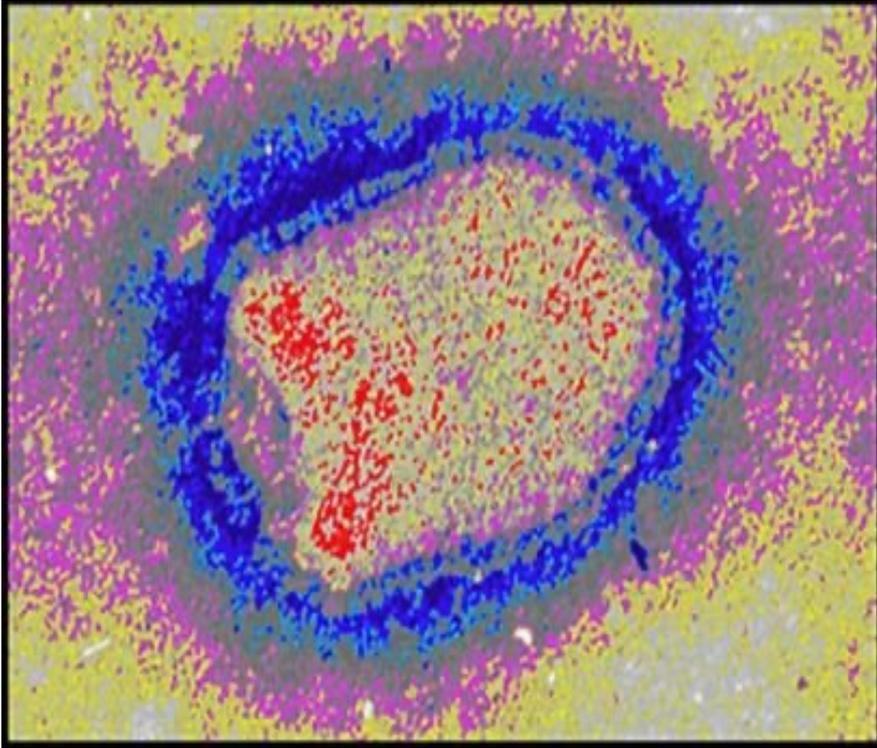
Il 6 luglio 1885 un bambino di nove anni fu morso alle gambe e alle mani da un cane affetto da rabbia. Sessanta ore dopo il morso il bambino, Joseph Meister, fu portato da L. Pasteur che aveva già sperimentato il suo vaccino sugli animali.

Nonostante le sue esitazioni Pasteur procedette con la “vaccinazione” iniettando durante 13 giorni il midollo spinale di conigli infettati con il virus della rabbia ed essiccati.

Il bambino sopravvisse ed il successo fu enorme.

Il primo marzo 1886 350 persone furono già vaccinate contro la rabbia e di queste solo 1 muore.

La fama di Pasteur fu talmente consolidata che nel 1888 nasce l' Istituto Pasteur per approfondire e continuare i suoi studi.



Lyssavirus (famiglia rabdovirus)

Joseph Meister



MAX THEILER E L' EREDITÀ DI PASTEUR



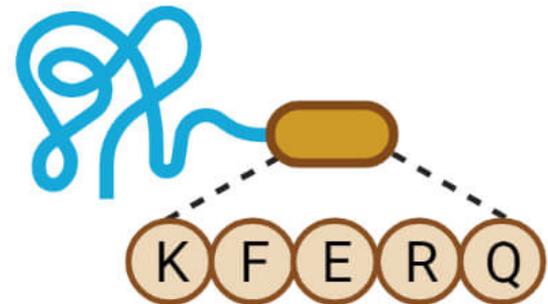
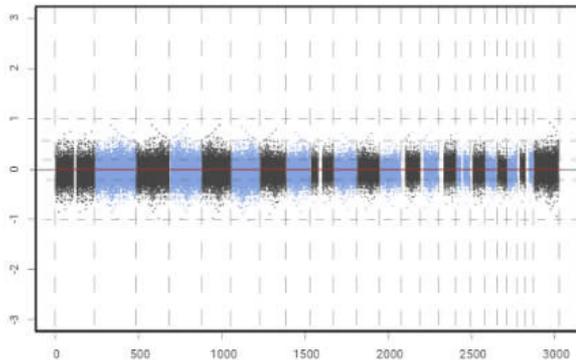
Premio Nobel 1951

- Nel 1920 Max Theiler sviluppò un ceppo attenuato di virus della febbre gialla (virus amarilico, arbovirus, famiglia delle Flaviviridae) dopo numerosi passaggi del virus selvatico Asibi in colture cellulari di embrioni pollo.
- Fra il passaggio 89 e 114 il virus perdeva la neurotossicità.
- Il ceppo, adattato ad espandersi su colture di embrione di pollo, venne chiamato 17D.
- Il virus 17D è stato somministrato a centinaia di milioni di persone dimostrando la sua immunogenicità e sicurezza.
- Tutto questo in un' era precedente a quella delle colture cellulari.

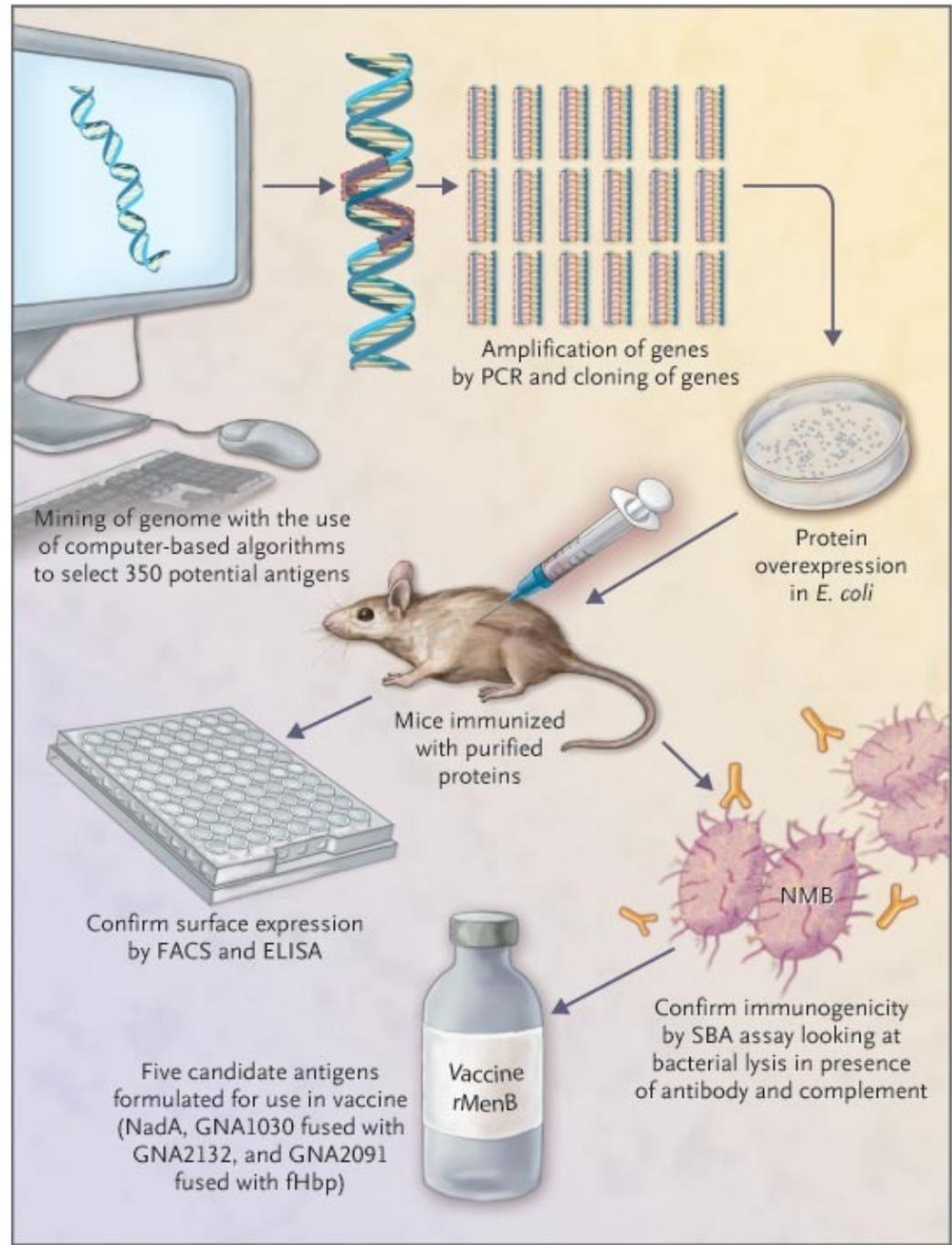
LA RIVOLUZIONE DELLA REVERSE VACCINOLOGY



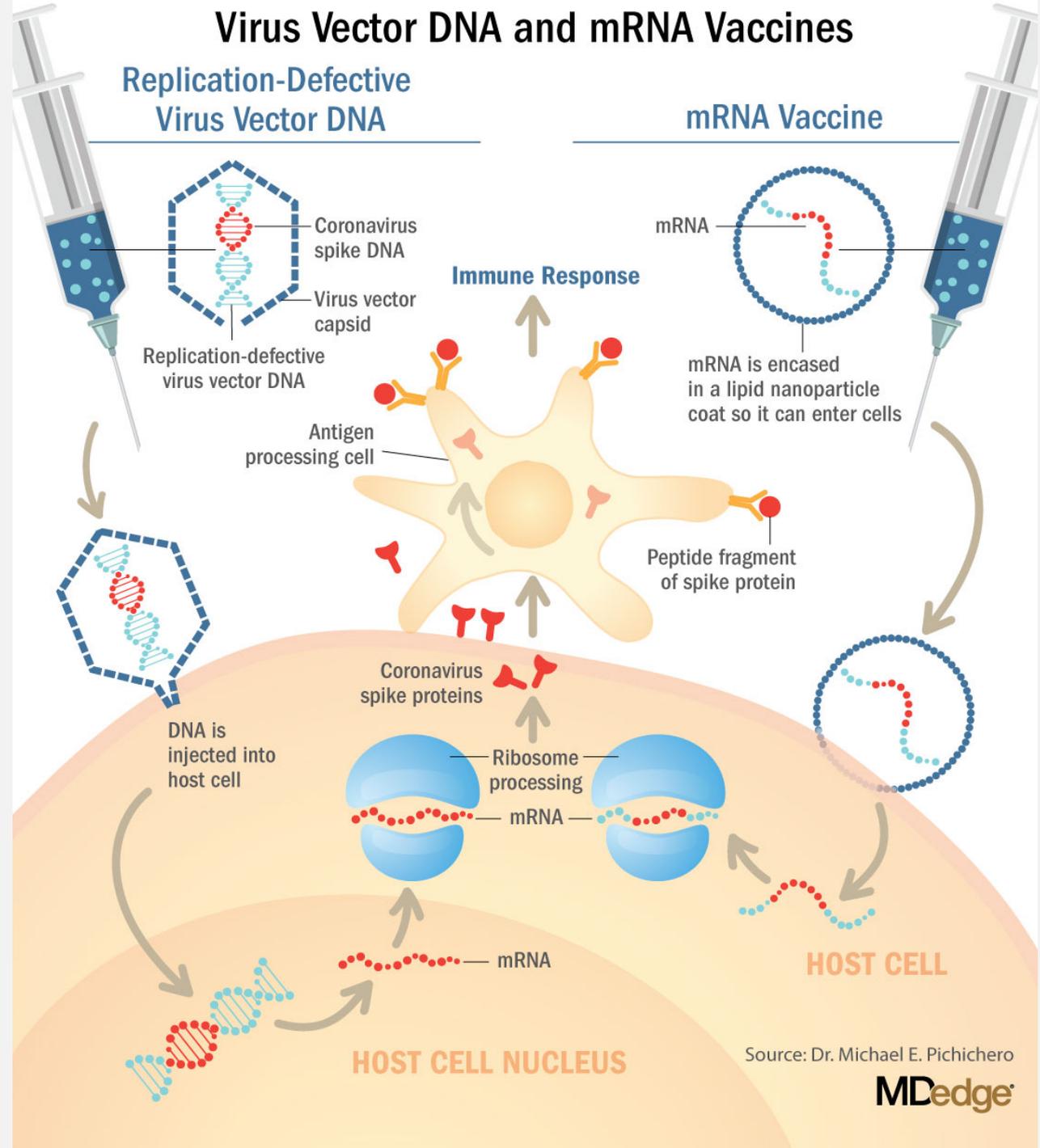
Reverse Vaccinology

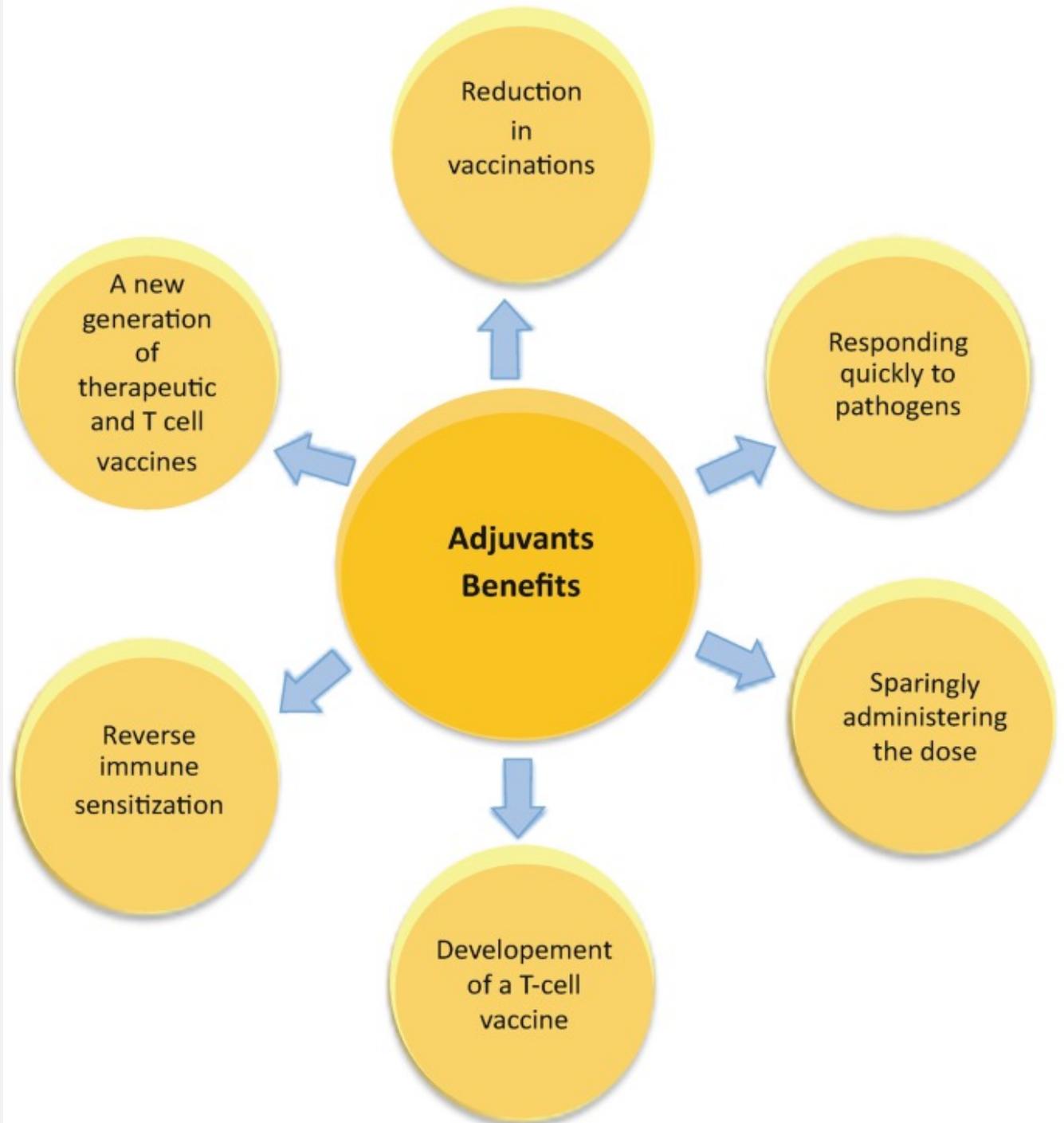


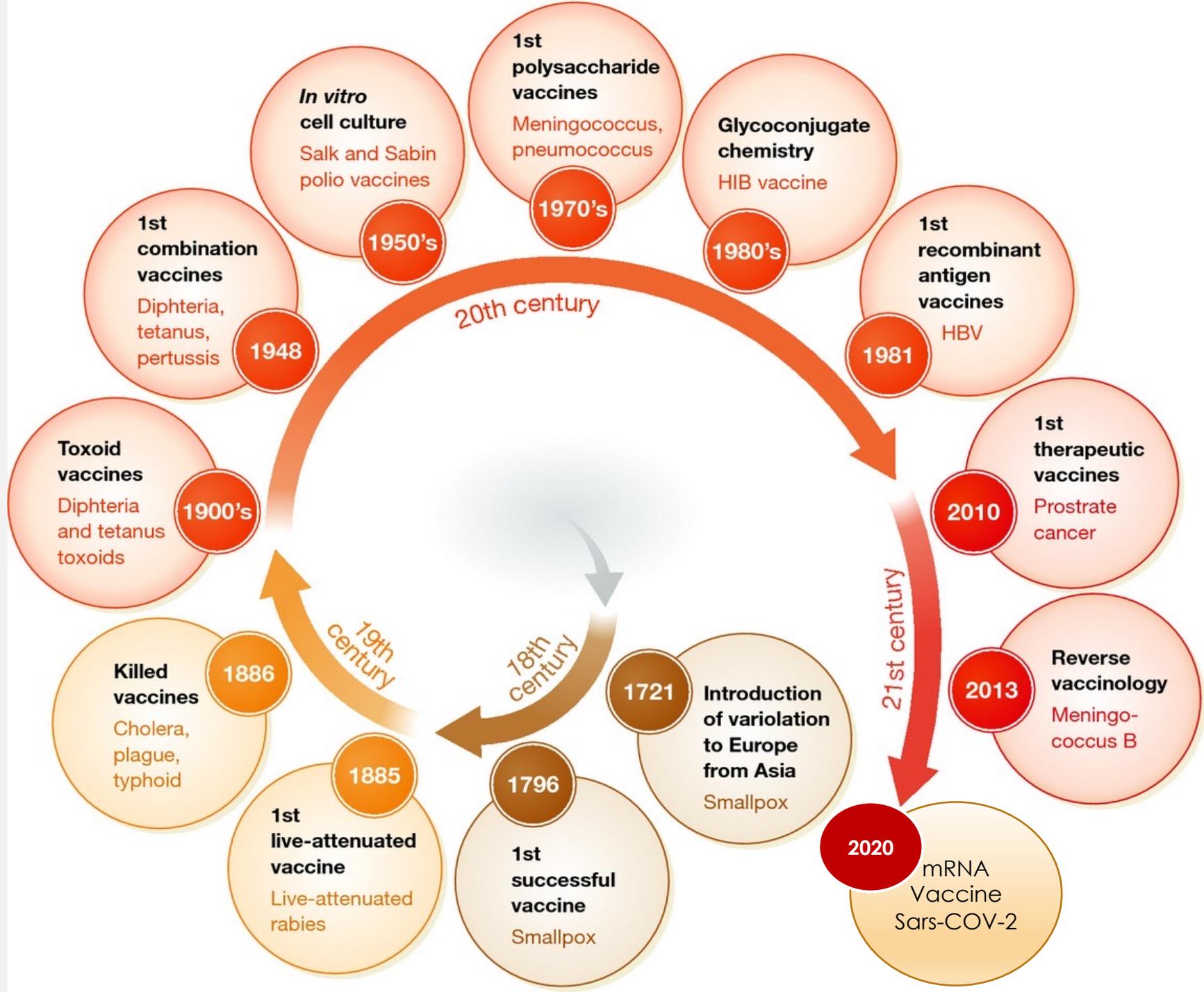
Il vaccino contro *N.meningiditis C*

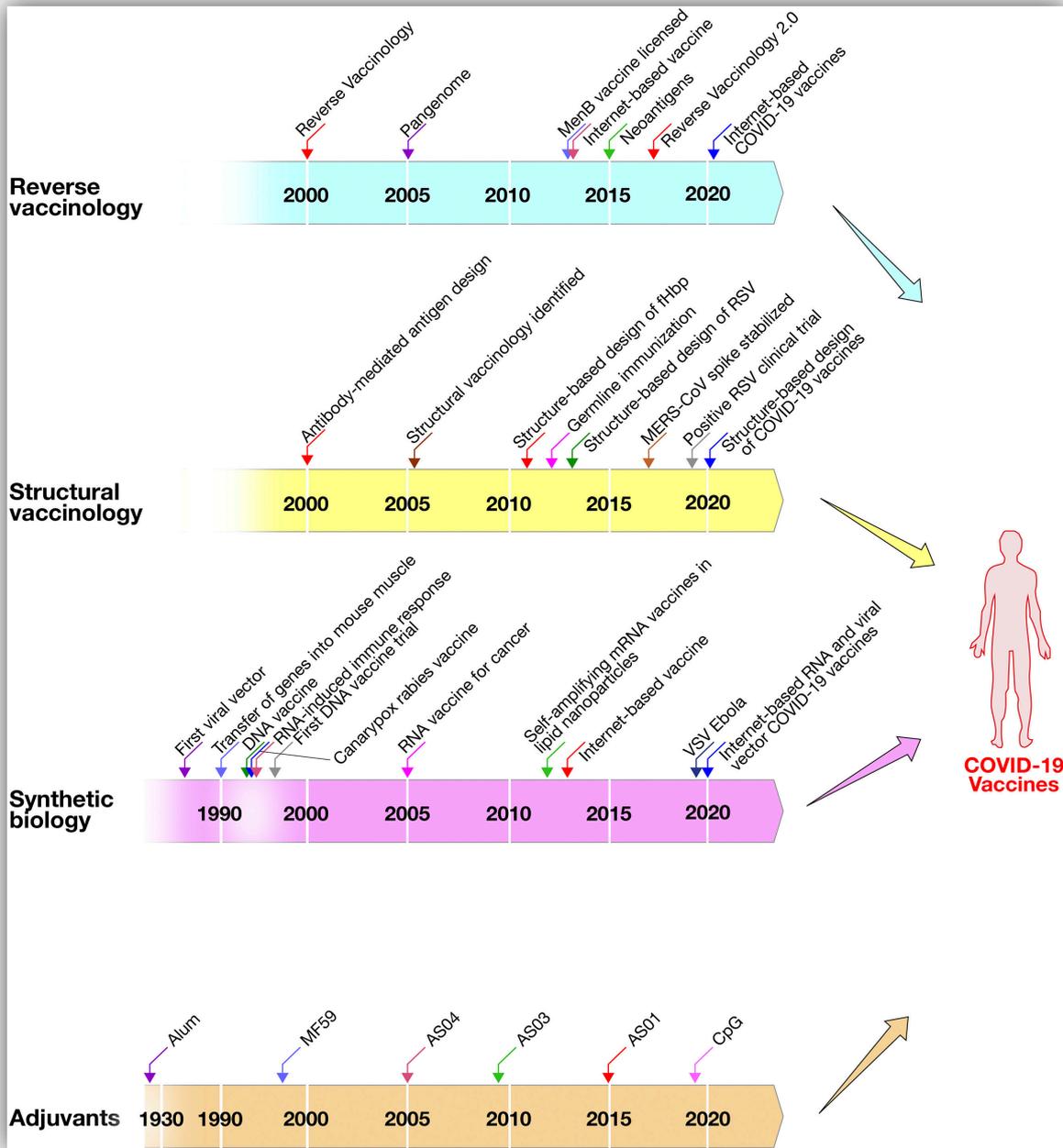


Virus Vector DNA and mRNA Vaccines

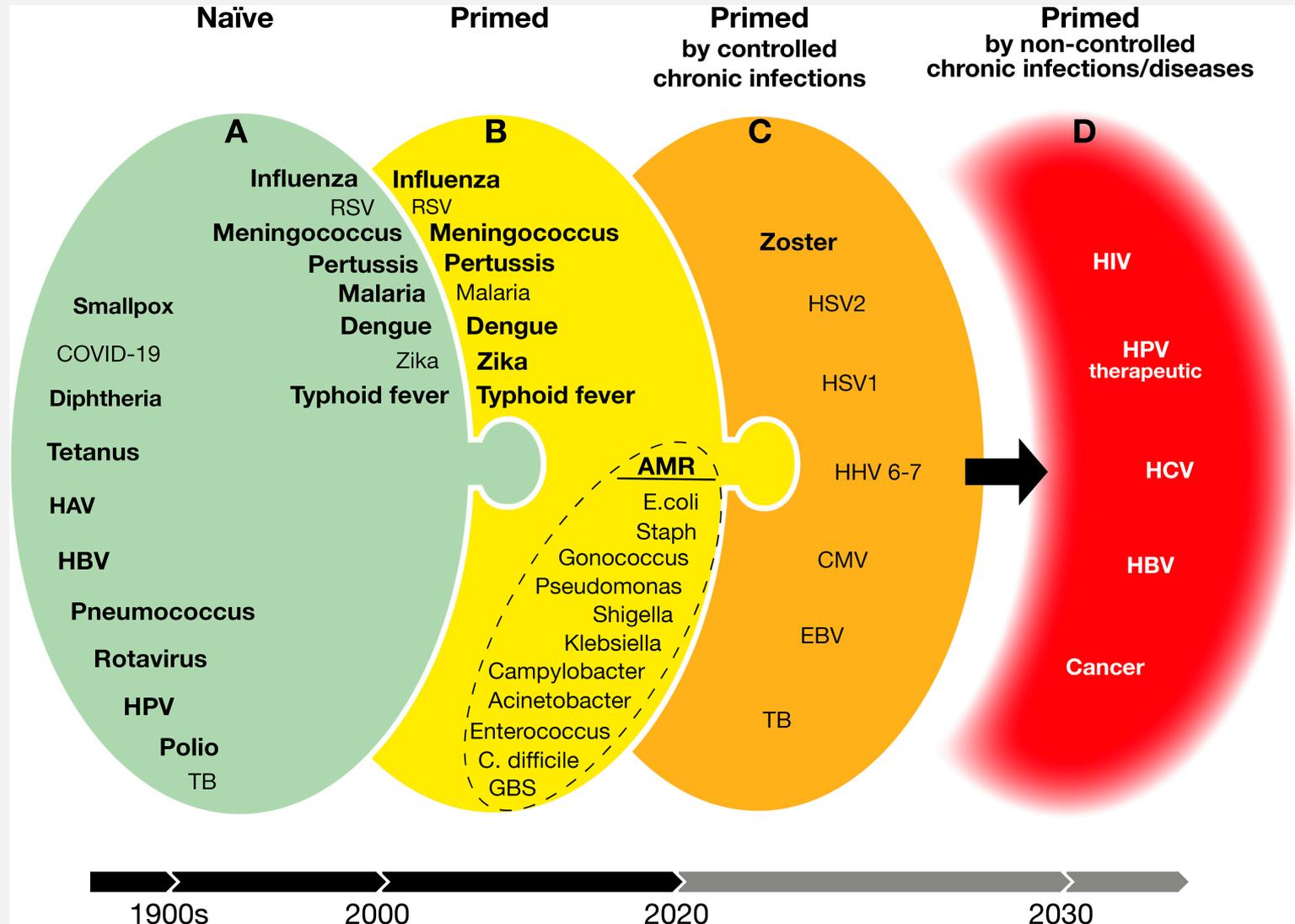








Il passato, il presente ed il futuro



HAV, hepatitis A virus; HBV, hepatitis B virus; HPV, human papillomavirus; TB, tuberculosis; RSV, respiratory syncytial virus; AMR, antimicrobial resistance; E. coli, Escherichia coli; Staph, Staphylococcus aureus; C. difficile, Clostridium difficile; GBS, group B Streptococcus; HSV1, herpes simplex virus 1; HSV2, herpes simplex virus 2; HHV, 6-7 human herpes viruses 6 and 7; CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; HIV, human immunodeficiency virus; HCV, hepatitis C virus.

« The impact of vaccination on the health of world's peoples is hard to exaggerate. With the exception of safe water, no other modality has had such a major effect on mortality reduction and population growth »

Susan and Stanley Plotkin
A Short History of Vaccination
in *Vaccines* 1st edition 1988

