

95. Clelia COLLOTTI-FERRETTI. — L'isolamento in coltura continua di un ceppo di cellule derivato da Amnion umano (Amnion I.S.S., 1960).

**Riassunto.** — È descritto l'isolamento in coltura continua di un nuovo ceppo cellulare derivato da Amnion umano (Amnion I.S.S.). Sono riportate le principali caratteristiche morfologiche delle cellule, e sono messe in rilievo le modificazioni subite dalle cellule nel corso del loro adattamento alle condizioni di coltura *in vitro*, in particolare per quanto riguarda i rapporti tra crescita stentata e forte aderenza al vetro e crescita rapida e minore aderenza al vetro.

**Summary.** — The propagation in continuous culture of a new strain of cells derived from human amnion (Amnion I.S.S.) is described and the main morphological characteristics are reported. The changes undergone by the cells during their adaptation to *in vitro* conditions are discussed, and in particular, the relationship between feeble growth and strong adherence to the glass, and rapid growth and weak adherence.

---

Da quando — con lo sviluppo dato da EARLE e coll. (<sup>1, 2, 3</sup>) alla tecnica delle colture di tessuto e il contributo di DULBECCO (<sup>4</sup>), SYVERTON e SCHERER (<sup>5</sup>) — la coltura delle cellule *in vitro* (coltura di tessuti, come abitualmente e impropriamente si dice) ha assunto il suo aspetto attuale, molte linee cellulari sono state isolate. Al primo ceppo ottenuto in coltura continua, il ceppo HeLa di GEY (<sup>6</sup>), altri ne sono seguiti ad opera di vari ricercatori. Così CHANG (<sup>7</sup>) nel 1954 riportò l'isolamento di cellule « similepiteliali » da tessuti umani normali (congiuntiva, fegato, rene, appendice); EAGLE (<sup>8</sup>), nel 1955, isolò il ceppo KB da un tumore ulcerato umano delle labbra e della lingua; BERMAN et al. (<sup>9</sup>) descrissero l'isolamento di un ceppo cellulare, morfologicamente simile al ceppo HeLa, dal midollo osseo di un paziente portatore di un cancro polmonare; successivamente gli stessi Autori (<sup>10</sup>) descrissero altri sette ceppi di cellule, tra loro morfologicamente simili, isolati da midollo osseo sternale, liquido ascitico carcinomatoso, liquido pleurico linfomatoso. JORDAN (<sup>11</sup>) riportò l'isolamento di due linee cellulari da mucosa nasale umana; SYVERTON et al. (<sup>12</sup>) descrissero l'isolamento di ceppi cellulari da esofago, palato, fegato e polmone umano. Cellule amniotiche furono usate per la prima volta da ZITCER et al. (<sup>13</sup>) in coltura primaria per la produzione su vasta

scala del virus della poliomielite. Successivamente, nel 1937, FOGH <sup>(14)</sup>, ZITCER et al. <sup>(15)</sup> ottennero, indipendentemente, da colture primarie di Amnion umano, dei ceppi in coltura continua: il ceppo FL di FOGH e i ceppi A 1, A 2, A 3, A 4, A 5, A 6, A 7 di ZITCER et al.

In questa nota è descritto l'isolamento in coltura continua di un ceppo cellulare da coltura primaria di Amnion umano (Amnion I.S.S.).

## MATERIALI E METODI

Le colture primarie sono state ottenute secondo la tecnica di ZITCER et al. <sup>(15)</sup>; unica differenza è stato l'uso del terreno basale di EAGLE <sup>(16)</sup> con il 20% di siero di vitello inattivato. Le colture primarie sono state fatte in bottiglie di Kolle, mentre per le subcolture si sono usati, oltre alle Kolle, anche tubi rotondi. Le cellule amniotiche sono state tenute in terreno basale di EAGLE, con l'aggiunta del 20% di siero di vitello, fino al 4° mese di vita *in vitro*; dopo di che il terreno basale di EAGLE venne sostituito con il « Minimum Essential Medium » dello stesso EAGLE <sup>(17)</sup> e la percentuale di siero portata gradualmente al 15%. In questo terreno le cellule sono tuttora mantenute (poco più di un anno di vita *in vitro*).

Per il trasferimento le cellule sono ora staccate dal vetro con soluzione di tripsina Difco (1:250) al 0,06% in soluzione salina priva di ioni Ca e Mg, secondo PUCK <sup>(18)</sup>.

Per l'osservazione microscopica, le cellule cresciute direttamente su vetrino coprioggetto in tubi di Leighton, sono state fissate in liquido di Bouin e colorate con ematossilina-eosina.

Per la curva di crescita e la determinazione dell'indice mitotico, si sono usati ancora tubi quadrati di Leighton con vetrino coprioggetto. Con una sospensione cellulare contenente circa 200.000 cellule/ml si è inoculata una serie di tubi (1 ml/tubo). A intervalli di tempo noti, quattro tubi erano presi a caso; di questi, due erano fissati con Bouin e successivamente colorati con ematossilina ferrica; sugli altri due si eseguiva il conteggio delle cellule; queste erano staccate dal vetro con tripsina 0,06% (2 ml/tubo, 15 minuti in termostato a 37°); il contenuto dei due tubi era quindi raccolto in un solo tubo, nel quale l'azione della tripsina era arrestata mediante l'aggiunta di 1,5 ml di siero di vitello; si aggiungevano ancora 0,5 ml di Tripanblau (soluzione 1,5%) e si contava la sospensione in emocitometro (camera di Bürker). Ai tubi preparati per la curva di crescita si cambiava il terreno tutti i giorni.

Per le prove di respirazione cellulare, le cellule venivano seminate in bottiglie di Roux; al 4° giorno, quando la coltura era semiconfluente, le cellule erano staccate dal vetro con versene <sup>(19)</sup>, lavate due volte con

terreno di EAGLE privo di siero e appositamente modificato (v. oltre) e sospese nello stesso terreno; le cellule erano quindi contaminate in emocitometro e la sospensione cellulare diluita in modo da contenere 1.000.000 di cellule/ml; aliquote di 2 ml di questa sospensione venivano distribuite in vaschette di Warburg e il volume portato a 3 ml con il terreno. Il consumo di Ossigeno era seguito per 2 ore a 37° con il metodo diretto di Warburg, usando 0,2 ml di KOH al 20% nel pozzetto centrale della vaschetta. Per queste prove di respirazione gli aminoacidi essenziali e le vitamine, nelle rispettive concentrazioni finali indicate per il « Minimum Essential Medium » di EAGLE, erano disciolti in soluzione salina di Hanks priva di bicarbonato. Il sistema tampone era rappresentato da Trisidrossimetilaminometano e fosfato monopotassico, che venivano aggiunti al terreno in modo che la loro concentrazione finale fosse, rispettivamente, 0,01M per il Tris e 0,005M per il fosfato monopotassico <sup>(20)</sup>.

## RISULTATI

Il ceppo di cellule amniotiche qui descritto è stato isolato da una coltura primaria di Amnion umano (\*). Al momento in cui ci è stata consegnata, la coltura primaria era in 3ª giornata: le cellule, cresciute in tappeto monostratificato, avevano coperto tutta la superficie di vetro della Kolle e accennavano, in alcuni punti, a degenerare per sovrappopolazione. Furono quindi sottoposte subito al trattamento con tripsina 0,06% (15 minuti in termostato a 37°). La quantità di cellule che con questo trattamento fu staccata dal vetro era minima, rispetto alle cellule che rimasero attaccate; ciò nondimeno, trasferite in una nuova Kolle, le cellule diedero origine a un tappeto pressochè confluyente. Nel successivo trasferimento fu usata tripsina al 0,25% in Hanks (10 minuti a 37°). Le cellule si staccarono dal vetro quasi completamente, risultandone, per le due subcolture in Kolle, inoculi piuttosto abbondanti; si ebbe però crescita assai limitata; le cellule degenerarono e da una sola bottiglia fu possibile recuperare poche cellule, con le quali fu inoculata una nuova Kolle. In questa, soltanto dopo molto tempo di incubazione comparvero poche colonie di cellule, che mantenevano ancora l'aspetto morfologico della coltura primaria: cellule generalmente fusate, alquanto rigonfie verso la parte centrale, non strettamente giustapposte una all'altra, con citoplasma chiaro, trasparente; le cellule crescevano in un solo strato e anche nelle colonie non mostravano alcuna tendenza a crescere su più

---

(\*) Ringraziamo il dott. A. Felici, per averci cortesemente fornito la coltura di partenza.

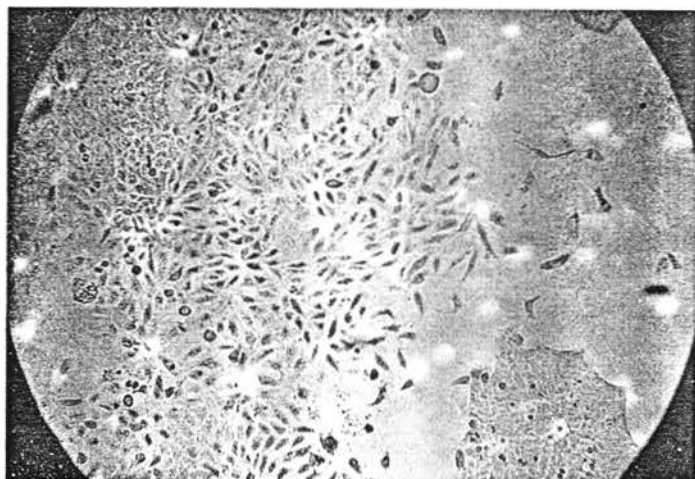


Fig. 1 - Coltura di c. amniotiche, fotografate nel corso del 3° mese di vita *in vitro*. Nella parte sinistra della fotografia, la crescita cellulare ha ancora l'aspetto morfologico della coltura primaria. A destra in basso una piccola colonia, con i caratteri morfologici che diverranno propri della coltura stabilita come linea cellulare.

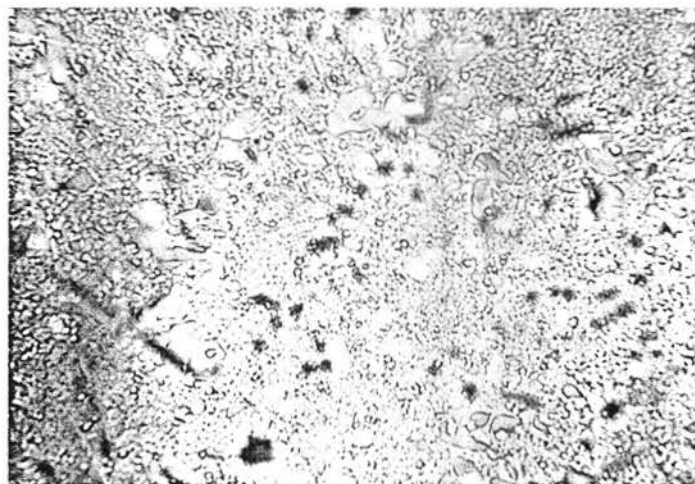


Fig. 2 - Tappeto semiconfluente di cellule amniotiche (Amnion I.S.S.), fotografate nel corso dell'8° mese di vita *in vitro*. Si noti l'aspetto simile a quello della colonia a destra, in basso, della fig. precedente.

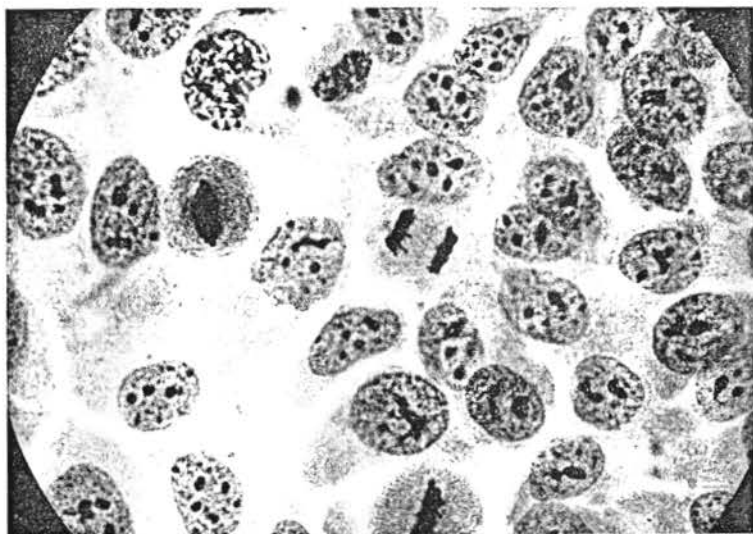


Fig. 3

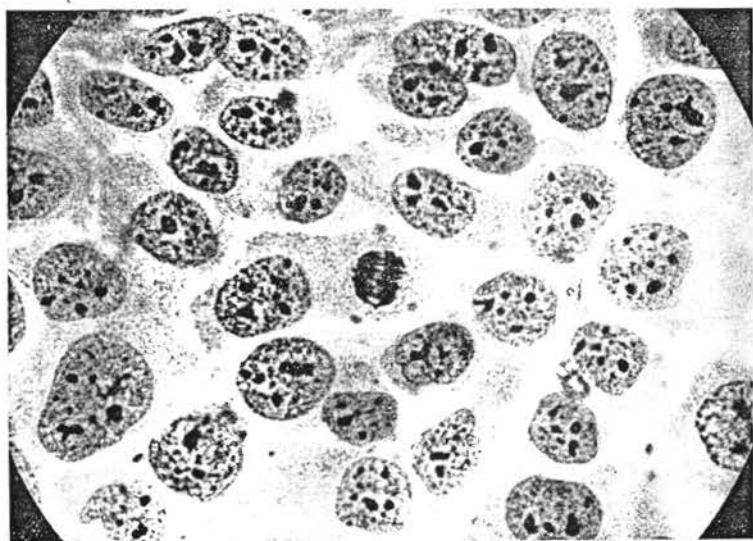


Fig. 4

Figg. 3 e 4 - AMNION I.S.S. - Aspetto microscopico delle cellule in coltura continua. Ematossilina ferrica, 800 x.

strati. Questa Kolle fu mantenuta, cambiando terreno ogni tre giorni, fino a che le cellule delle colonie, che erano progressivamente aumentate di volume, cominciarono a mostrare segni di sofferenza. La Kolle fu allora tripsinizzata, usando tripsina al 0,12% in soluzione salina secondo Puck, e data la piccolezza del pacchetto cellulare ottenuto dopo centrifugazione, con la risultante sospensione furono inoculati solo quattro tubi. In questi dopo parecchi giorni cominciarono a notarsi piccole colonie, del tipo morfologico già descritto. Le cellule di uno di questi tubi, staccate con tripsina al 0,12% (10 minuti a 37°) e trasferite in un altro tubo, diedero origine in poco più di 24 ore a una crescita rigogliosa di piccole colonie di aspetto macroscopicamente granuloso e microscopicamente costituite da cellule piccole, rotondeggianti, con spiccata tendenza a una crescita tridimensionale. Nei giorni successivi le cellule si appiattivano, aderendo completamente al vetro, ma continuavano a crescere ancora verso l'interno del tubo, formando colonie cellulari densissime. Con le cellule di questo tubo, staccate con tripsina 0,06%, furono inoculati quattro tubi, nei quali la crescita cellulare aveva le medesime caratteristiche: notevolmente più rapida che nei primi passaggi, aveva perso decisamente l'aspetto di tappeto sottilissimo di cellule chiare, trasparenti, non strettamente aderenti una all'altra, per assumere quello di un tappeto di cellule strettamente attaccate tra loro, di forma poliedrica, meno chiare e con una certa tendenza a sovrapporsi.

Quasi contemporaneamente a questo cambiamento verificatosi nelle colture in tubi, in una Kolle con inoculo cellulare bassissimo, lasciata in termostato con cambi occasionali di terreno, fu notata, esattamente dopo un mese, la comparsa di colonie macroscopicamente ben visibili, costituite, microscopicamente, da cellule piccole, rotondeggianti, strettamente aderenti tra loro e sovrapposte in più piani. Queste cellule furono parzialmente staccate dal vetro mediante ripetuto pipettamento con il terreno abituale e trasferite in una nuova Kolle: in questa le cellule crebbero rapidamente, mostrando nella stessa bottiglia i due tipi di crescita su accennati: accanto a zone di cellule prevalentemente fuse non strettamente giustapposte, chiarissime e trasparenti, si osservavano piccole colonie di cellule poliedriche, strettamente aderenti tra loro, più piccole; in qualche campo microscopico, i due tipi cellulari coesistevano, senza un netto limite tra loro (fig. 1).

Al trasferimento successivo (tripsina 0,06%, 10 minuti a 37°) il primitivo aspetto della coltura primaria scomparve definitivamente; la coltura presentava i medesimi caratteri già notati nei tubi: al principio, la crescita era macroscopicamente « granulosa »: e questo aspetto era dovuto in parte al fatto che le cellule rimanevano a lungo rotondeggian-

ti, dopo essersi attaccate al vetro, in parte al fatto che si ammucchiavano notevolmente, tendendo a crescere in più strati verso l'interno del recipiente. Con questi caratteri, comparsi dopo due mesi e mezzo di coltura *in vitro*, le cellule si sono mantenute finora, seppure la tendenza alla crescita tridimensionale è ora notevolmente ridotta (fig. 2).

# CARATTERISTICHE

Le cellule amniotiche umane di questo nuovo ceppo crescono rigogliosamente nel « Minimum Essential Medium » di EAGLE con il 15% di

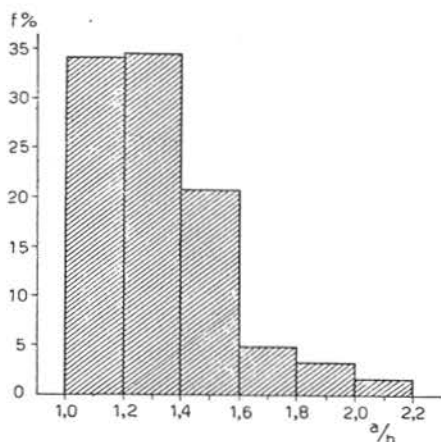


Fig. 5. - Istogramma delle f% dei rapporti fra diametro massimo (a) e diametro minimo (b) dei nuclei.

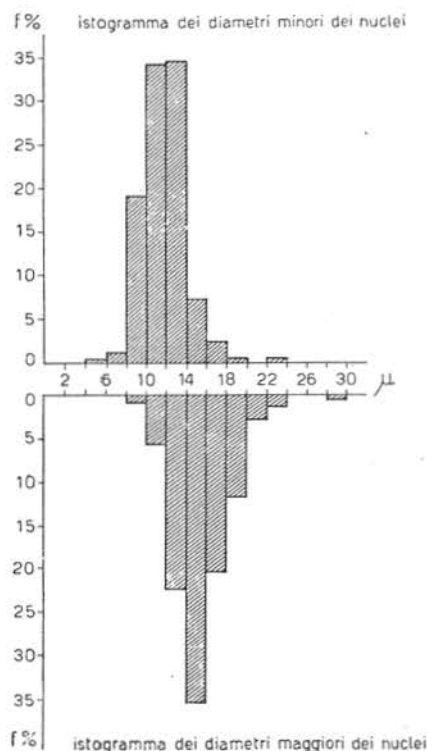


Fig. 6. - Istogramma dei diametri dei nuclei.

siero di vitello inattivato. Sono trasferite ogni quattro giorni con un cambio del terreno al secondo giorno.

Microscopicamente (figg. 3, 4) le cellule mostrano una grande varietà

di forma e di grandezza; frequenti le cellule giganti, per lo più plurinucleate, relativamente frequenti le mitosi tri- e tetrapolari. I nuclei in riposo appaiono rotondeggianti o più o meno ovoidali: dalle misure di 400 nuclei presi a caso in preparati colorati con ematossilina-eosina si deduce che il rapporto tra il diametro maggiore e il diametro minore dei nuclei varia da 1:1 a 1:2,2 (fig. 5); il diametro maggiore misura da 8 a 30  $\mu$ , il

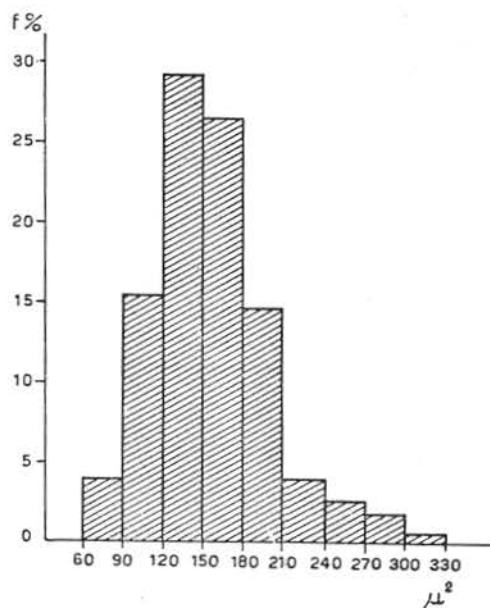


Fig. 7. - Istogramma delle f% delle aree dei nuclei.

diametro minore da 4 a 24  $\mu$  (fig. 6); la superficie dei nuclei misura da 60 a 330  $\mu^2$  (fig. 7). Come si può rilevare dalle figg. 6 e 7, le curve che rappresentano la distribuzione di frequenza dei due diametri e delle superfici nucleari non sono perfettamente simmetriche ma appaiono leggermente più espanse verso destra.

Nelle condizioni sperimentali sopra ricordate la crescita è logarithmica (fig. 8), il tempo di generazione è di circa 35 ore, la frequenza delle mitosi è del 6-7%.

Il consumo di ossigeno è di 5,5  $\mu$ l/milione di cellule/ora, cioè dello stesso ordine di grandezza riscontrato con gli altri ceppi in coltura continua provati (HeLa, KB, PF, Fe).

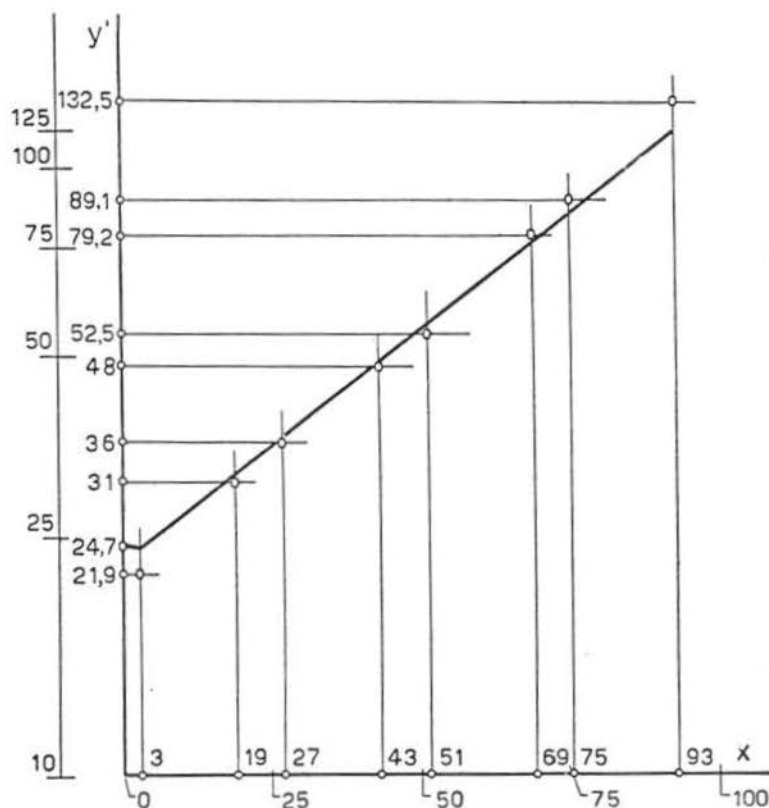


Fig. 8. - Curva di crescita di cellule amniotiche in coltura continua.  
 $y' \cdot 10^4$  = numero di cellule per tubo,  $x$  = ore dall'inoculo.

## CONCLUSIONE

In base ai risultati ottenuti si può concludere che nell'isolamento del ceppo di Amnion I.S.S. si sono osservate due fasi, nettamente distinte una dall'altra.

La prima, della durata di due mesi e mezzo circa, è stata caratterizzata da una velocità di moltiplicazione cellulare molto bassa e da una fortissima aderenza delle cellule al vetro, comprovata dalla estrema difficoltà con la quale le cellule si staccavano dal vetro. In questa fase le cellule, molto appiattite e trasparenti, non erano strettamente aderenti tra loro, pur costituendo — almeno nei primi passaggi — dei tappeti confluenti di crescita cellulare.

La seconda fase, comparsa improvvisamente nelle colture in tubi (più gradualmente per quelle in Kolle, in quanto le colonie di cellule con il nuovo aspetto si sono sviluppate nel periodo di un mese) è stata

caratterizzata da una maggiore velocità di moltiplicazione, da una molto minore aderenza al vetro (le cellule si staccano ora dal vetro con trip-sina 0,06% in pochi minuti a temperatura ambiente, più rapidamente cioè degli altri ceppi in coltura continua tenuti nel nostro laboratorio), e da una crescita sotto forma di tappeto continuo di cellule poliedriche, strettamente aderenti tra loro.

Che le cellule, prima di stabilirsi in coltura continua, passino attraverso stadi di morfologia e di velocità di accrescimento diversi da quelli finali, è stato rilevato e descritto anche da altri Autori <sup>(21, 22)</sup>. Quello che qui sembra interessante mettere in evidenza è il rapporto tra crescita stentata e forte aderenza al vetro, da una parte, e crescita relativamente rapida e scarsa aderenza al vetro dall'altra, per la quale le cellule appena confluite, tendono a staccarsi spontaneamente dal vetro stesso.

Per quanto non manchi nella letteratura qualche ricerca volta a stabilire le modificazioni che si accompagnano all'adattamento delle cellule alle condizioni di coltura *in vitro* <sup>(23, 24, 25, 26)</sup>, l'Amnion umano, per la semplicità di allestimento delle colture primarie, può forse rappresentare un materiale particolarmente adatto per uno studio del genere.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

#### BIBLIOGRAFIA

- <sup>(1)</sup> EVANS V. J. e EARLE W. R. - J. nat. Cancer Inst., 8: 103 (1947).
- <sup>(2)</sup> EARLE W. R., EVANS V. J., SANFORD K. K., SHANNON J. E. e WALTZ H. K. - J. nat. Cancer Inst., 12: 363 (1951).
- <sup>(3)</sup> EARLE W. R., EVANS V. J. e SCHILLING E. L. - J. nat. Cancer Inst., 10: 943 (1950).
- <sup>(4)</sup> DULBECCO R. e VOGT M. - J. exp. Med., 99: 167 (1954).
- <sup>(5)</sup> SYVERTON J. T. e SCHERER W. F. - Ann. N. Y. Acad. Sci., 58: 1056 (1954).
- <sup>(6)</sup> GEY G. O. - Cancer Research, 12: 264 (1952).
- <sup>(7)</sup> CHANG R. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 87: 440 (1954).
- <sup>(8)</sup> EAGLE H. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 89: 362 (1955).
- <sup>(9)</sup> BERMAN L., STULBERG C. S. e RUDDLE F. H. - Blood, 10: 896 (1955).
- <sup>(10)</sup> BERMAN L. e STULBERG C. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 92: 730 (1956).
- <sup>(11)</sup> JORDAN W. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 92: 867 (1956).
- <sup>(12)</sup> SYVERTON J. T. e McLAREN L. C. - Cancer Research, 17: 923 (1957).
- <sup>(13)</sup> ZITCER E. M., FOGH J. e DUNNEBACKE T. H. - Science, 122: 30 (1953).
- <sup>(14)</sup> FOGH J. e LUND R. O. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 94: 532 (1957).
- <sup>(15)</sup> DUNNEBACKE T. H. e ZITCER E. M. - Cancer Research, 17: 1043 (1957).
- <sup>(16)</sup> EAGLE H. - Science, 122: 504 (1953).
- <sup>(17)</sup> EAGLE H. - Science, 130: 432 (1959).
- <sup>(18)</sup> MARCUS Ph. I., CIECIURA S. J. e PUCK Th. T. - J. exp. Med., 104: 615 (1956).
- <sup>(19)</sup> ZWILLING E. - Science, 120: 219 (1954).
- <sup>(20)</sup> GREEN M., HENLE G. e DEINHARDT F. - Virology, 5: 206 (1958).
- <sup>(21)</sup> WESTWOOD J. C. N. e TITMUS D. H. J. - Brit. J. exp. Path., 38: 587 (1957).
- <sup>(22)</sup> ZITCER E. M. e DUNNEBACKE Th. H. - Cancer Research, 17: 1047 (1957).
- <sup>(23)</sup> PARKER R. - J. exp. Med., 64: 121 (1936).
- <sup>(24)</sup> MOORE A. E., SOUTHAM C. M. e STERNBERG S. S. - Science, 124: 127 (1956).
- <sup>(25)</sup> PAUL J. e PEARSON E. S. - Exp. Cell Res., 12: 212 (1957).
- <sup>(26)</sup> PAUL J. e PEARSON E. S. - Exp. Cell Res., 12: 223 (1957).

96. A. FELICI e R. VOZZA. — Ricerche virologiche sul tracoma. Dati preliminari.

**Riassunto.** — Vengono descritti i risultati ottenuti nel corso delle ricerche condotte sulla malattia tracomatosa dal 1957 al 1960.

Il programma delle ricerche, eseguite in collaborazione con il Centro Oftalmico Hailè Sellassié I di Asmara, ha avuto come principale obiettivo lo studio dei seguenti punti:

1) Isolamento ed identificazione dei corpuscoli elementari quali agenti dell'infezione tracomatosa.

2) Patogenicità per l'uomo e per gli animali di laboratorio.

3) Concentrazione e purificazione dei corpuscoli elementari.

4) Studio della situazione immunitaria nel corso della malattia naturale.

5) Cutireazione.

6) Vaccinazione nell'uomo e negli animali come mezzo per la prevenzione e la cura della malattia sia sperimentale che naturale.

Sono stati isolati 7 ceppi di corpuscoli elementari del virus del tracoma, capaci di trasmettere la malattia sia nell'uomo che nelle scimmie.

Sospensioni di corpuscoli elementari vitali risultano tossiche per il topo adulto inoculato endovena.

E' possibile purificare e concentrare sospensioni grezze di corpuscoli elementari al punto di ottenere un'antigene utilizzabile sia per le reazioni serologiche che per le prove di vaccinazione.

Lo studio comparativo dei risultati ottenuti con più metodi serologici ha dimostrato la superiorità della reazione di microagglutinazione, quale metodo per la dimostrazione di uno stato immunitario (75% circa), negli individui naturalmente infettati.

La cutireazione eseguita su un notevole numero di bambini e giovani ha fornito percentuali di positività variabili dal 91 al 76%, a seconda delle fasi di evoluzione della malattia.

Le prove di vaccinazione, eseguite con vaccini di diversa costituzione, acquoso, adsorbito su idrossido di alluminio ed emulsionato con coadiuvanti oleosi, hanno dimostrato, in base all'esame clinico, una evidente azione protettiva verso la malattia sperimentale sia nell'uomo che in una delle due specie di scimmie sensibili, da noi studiate (*Cercopithecus griseoviridis*).

Le prove di vaccino-terapia hanno dato anch'esse risultati favorevoli ma il tempo di osservazione è ancora troppo breve per poter esprimere un parere definitivo.

**Summary.** — The results of studies on trachoma carried out from 1957 to 1960 are described. The work was performed in collaboration with the Hailè Sellassie Ophthalmic Center of Asmara. The principle objectives included the following items:

1) Isolation and identification of the elementary bodies of trachoma infection.

2) Pathogenicity towards man and laboratory animals.

3) Concentration and purification of the elementary bodies.

4) Study of the immune reaction during natural illness.

5) Skin reaction.

6) Vaccination of man and animals for the prevention and cure of experimental and natural infections.

Seven strains of elementary bodies of trachoma virus were isolated which could transmit the disease to man and monkeys.

Suspensions of live elementary bodies were toxic when inoculated intravenously to adult mice.

Crude suspensions of elementary bodies could be purified to give a usable antigen for serological reactions and vaccination tests.

Comparative tests with various serological methods showed the microagglutination reaction to be the best for demonstrating an immune state (about 75%) in naturally infected individuals.

Skin reactions on a large number of children and young people gave a variable percentage of positivities from 91 to 73% depending on the stage of the disease.

Vaccination tests were performed with vaccines which had been absorbed on aluminium hydroxide and emulsified with oily adjuvants. Clinical examinations showed a significant protective action against experimental infection in man and in one of the two sensitive species of monkey tested (*Cercopithecus griseoviridis*).

Treatment by vaccination also gave favorable results but the time of observation has been too short for any definite conclusions to be drawn.

---

## GENERALITA'.

Il tracoma, infezione cronica ricorrente della congiuntiva umana è diffuso in tutti i continenti, colpendo complessivamente circa un quinto dell'intera popolazione mondiale e rappresentando la causa prima di disturbi di vario grado della funzione visiva e degli annessi oculari.

Questa malattia costituisce, in molti paesi, un vero problema sociale la cui importanza ha suscitato l'interessamento diretto della Organizzazione Mondiale della Sanità e di altre Organizzazioni Internazionali. Da alcuni anni il nostro Istituto, quale centro nazionale per lo studio della malattia tracomatosa, affiliato all'O.M.S., ha intrapreso in collaborazione con la Clinica Oculistica della Università di Roma, diretta dal Prof. G. B. Bietti, una serie di ricerche cliniche e sperimentali allo scopo di portare un contributo allo sforzo condotto in altre parti del mondo.

Tali ricerche, iniziate nel 1957, sono tutt'ora in fase di sviluppo e sono state svolte e si svolgono in collaborazione con due Laboratori pilota situati uno in Africa settentrionale, Reparto Oculistico di Tripoli e l'altro in Africa orientale, Centro Oftalmico di Asmara diretto dal Prof. P. Guerra.

Verranno descritti successivamente i risultati ottenuti nei vari periodi della ricerca.

*Anno 1957.* — Le ricerche iniziate in questo anno hanno avuto lo scopo di confermare la veridicità dell'avvenuto isolamento e coltivazione in serie del virus tracomatoso segnalati da un Autore giapponese nel 1950 <sup>(1)</sup>.

Abbiamo avuto il così detto ceppo Ohuti del virus tracomatoso nel marzo 1957.

Attraverso una tecnica particolarmente complicata che non riferiamo, in quanto non utile, si è cercato di evidenziare le lesioni riscontrate dall'Autore, senza però ottenere alcun risultato, per cui si è concluso per l'assoluta mancanza del virus nell'inoculo adoperato ed ora, epicriticamente, sulla assoluta inefficienza della tecnica prospettata dall'Autore al fine di coltivare l'agente della malattia tracomatosa.

*Anno 1958* <sup>(2)</sup>. In questo anno, quando ancora non si era avuta notizia dell'avvenuto isolamento del virus tracomatoso, ottenuto in Cina <sup>(2)</sup>, è stato attuato un programma che ha previsto:

1) isolamento del virus tracomatoso;

2) produzione di un antisiero specifico per la dimostrazione immunologica del virus mediante gli anticorpi fluorescenti.

1) *Isolamento del virus tracomatoso.*

I prelievi congiuntivali sono stati raccolti in Africa settentrionale e orientale da pazienti in fase acuta della malattia.

Il materiale congiuntivale, raccolto mediante grattamento della congiuntiva della palpebra superiore, veniva sospeso in liquido di Hanks contenente streptomicina nella proporzione di 200 gamma per cm<sup>3</sup> ed inviato per via aerea in laboratorio entro thermos refrigerato.

I tentativi di isolamento, condotti con uova embrionate di pollo in sesta giornata di sviluppo e inoculate nel sacco del tuorlo, nonchè i tentativi in colture di tessuti umani ed animali risultarono sempre negativi.

Gli esperimenti vennero notevolmente disturbati da inquinamenti batterici e microbici.

Con materiale tracomatoso fresco, prelevato in Africa settentrionale, si tentò anche l'infezione congiuntivale di scimmie rhesus trattate con cortisone, alla dose complessiva di 200 mg., somministrata nei primi tre giorni dopo l'inoculazione. Il tasso cortisonico veniva poi mantenuto con due iniezioni settimanali da 100 mg. ciascuna.

Non si ebbe nessuna alterazione evidente della congiuntiva della scimmia ed il tentativo di isolamento, successivamente tentato, dalla congiuntiva rimasta sana dell'animale, in uova embrionate, è risultato negativo.

2) *Produzione di un antisiero specifico per la dimostrazione immunologica del virus mediante gli anticorpi fluorescenti.*

Il raschiato congiuntivale di 100 individui tracomatosi, sospeso in liquido di Hanks, dopo essere stato sottoposto a tre congelamenti e scongelamenti rapidi, venne centrifugato a 3.000 gpm per 10 minuti. per allontanare i residui cellulari. Il sopranatante venne emulsionato con coadiuvanti oleosi secondo la tecnica di Freund ed inoculato con due iniezioni intramuscolari, a 7 giorni l'una dall'altra, a 4 conigli e 4 scimmie della specie rhesus. I prelievi dei sieri vennero eseguiti a distanza di 2 mesi dall'ultima iniezione.

I sieri così ottenuti vennero saggiati su strisci congiuntivali raccolti in Africa settentrionale, essiccati e disidratati con acetone, prima di essere spediti in scatole refrigerate per via aerea. Per il rivelamento dell'antigene nelle cellule, si è tentato l'impiego della tecnica degli anticorpi fluorescenti secondo il metodo indiretto [per la tecnica vedi (4)] impiegando, oltre ai due sieri supposti iperimmuni, anche sieri umani di persone affette dalla malattia nella fase delle manifestazioni acute.

I risultati ottenuti, non sono stati facilmente interpretabili, in rap-

porto alla presenza di una notevole fluorescenza aspecifica che ha costantemente impedito la lettura della reazione (5).

*Anno 1959* (6). In quest'anno si è cercato di stabilizzare nel nostro laboratorio, due ceppi di virus tracomatoso isolati l'uno nello stato di Israele e l'altro nell'isola di Giava, fornitici rispettivamente dai Dottori Bernkopf (Tel Aviv) e Sie (Djakarta), il primo allo stato fluido ed il secondo liofilizzato.

L'inoculazione nel sacco del tuorlo di uova embrionate al 6° giorno di sviluppo, ha determinato la morte dell'embrione entro 3-8 giorni. Gli strisci della membrana del sacco del tuorlo mostravano la presenza di uno scarso numero di corpuscoli elementari e la mortalità riscontrata si aggirava sul 49%.

Si è potuto constatare che ambedue i ceppi si sviluppavano meglio nelle uova di galline allevate in condizioni naturali anzichè in uova embrionate provenienti da allevamenti, e ciò è presumibilmente in rapporto alla presenza di sostanze antibiotiche usate come fattori di crescita nei mangimi adoperati negli allevamenti.

In questo periodo si è notato come l'inoculazione preliminare nelle uova di 0,2 mg. di acetato di cortisone, elevasse la mortalità degli embrioni di circa il 20%.

Le modalità tecniche prevedevano l'impiego, come diluente, del liquido di Hanks, e l'uso di un congelatore a  $-20^{\circ}$  C. Non veniva eseguito il congelamento rapido dei materiali, ed il virus, per i successivi passaggi, era raccolto dalle uova morte.

In complesso, l'esperienza del 1959 ci ha fatto notare la capricciosità e l'incostanza dei risultati e, in una parola, la difficoltà di coltivazione del virus.

*Anno 1960.* Nell'aprile di quest'anno abbiamo iniziato, presso il laboratorio virologico dell'Ospedale Oftalmico Hailè Sellassiè 1° di Asmara, un piano di ricerche allo scopo di portare un ulteriore contributo alla conoscenza dei problemi virologici connessi con l'infezione tracomatosa.

Tale piano di ricerche ha previsto inizialmente: l'isolamento di corpuscoli elementari e la successiva coltura in uova embrionate di pollo; lo studio della patogenicità, per l'uomo e per gli animali, dei corpuscoli elementari coltivati; la concentrazione e purificazione dei corpuscoli elementari, al duplice scopo di ottenere una sospensione utilizzabile nel corso della ricerca serologica e nel tentativo di una vaccinazione; lo studio della situazione immunitaria nel corso della malattia naturale; la valutazione della utilità di una prova cutanea nella diagnosi di infezione

tracomatosa; la valutazione della innocuità ed efficacia di vaccini di differente costituzione impiegati nella prevenzione e nella vaccinoterapia della infezione spontanea e provocata.

I vari punti riferiti verranno qui appresso illustrati con particolare riguardo alle modalità di tecnica impiegate.

*Isolamento ed identificazione dei corpuscoli elementari quali agenti dell'infezione tracomatosa.*

La ricerca in tal senso si è svolta, per ragioni contingenti, in due fasi distinte. Dalla valutazione comparativa dei risultati ottenuti in ciascuna di esse, scaturiscono un insieme di dati utili per stabilire i criteri ottimali per l'isolamento del virus: è per questa ragione che tali fasi verranno descritte separatamente.

**1<sup>a</sup> Fase. — Metodi ed apparecchiatura.**

Congelatore a  $-23^{\circ}$  C.

Diluyente: (per la raccolta dei materiali congiuntivali e per i successivi passaggi dei sacchi del tuorlo).

Soluzione fisiologica con brodo al 10%, addizionata di streptomina 20.000 gamma/cm<sup>3</sup>.

Inoculum: 0,1 cm<sup>3</sup>/uovo per la via del tuorlo, un'ora dopo l'inoculazione, per la stessa via, di 0,2 mg di cortisone/uovo.

Il passaggio cieco è stato effettuato a distanza di 6-7 giorni dalla inoculazione.

Risultati: Sono stati saggiati 8 materiali senza ottenere, al 4° passaggio cieco, l'evidenza di corpuscoli elementari.

**2<sup>a</sup> Fase. — Metodi ed apparecchiatura.**

Congelatore a  $-70^{\circ}$  C.

Diluyente: Soluzione PGS (7) addizionata di streptomina 20.000 gamma/cm<sup>3</sup>.

Inoculum: 0,2 cm<sup>3</sup>/uovo per la via del tuorlo senza inoculazione preliminare di cortisone.

Il passaggio cieco è stato effettuato al 10° giorno dall'inoculazione (congelamento rapido dei materiali: materiale congiuntivale e membrane raccolte).

Risultati: Tre delle otto membrane del tuorlo, precedentemente negative sino al 4° passaggio in uovo, sono risultate positive per la presenza di corpuscoli elementari, al primo passaggio eseguito secondo le nuove modalità.

Di quattro nuovi casi presi in considerazione, tre sono risultati positivi al passaggio di isolamento ed uno al secondo passaggio.

Diamo ora la descrizione dettagliata delle modalità impiegate per la scelta dei casi idonei all'isolamento e per la coltura successiva del virus.

Sono stati scelti casi con tracoma in fase II e III (\*) e, salvo rare eccezioni, casi che presentassero l'evidenza di inclusioni citoplasmatiche nello striscio congiuntivale. Sono stati preferiti casi mai trattati con antibiotici o comunque casi in cui la terapia antibiotica era stata sospesa 15 o più giorni prima del prelievo.

Il prelievo del materiale è stato effettuato presso il laboratorio o direttamente nei villaggi, facendo uso di una spatola metallica da iride e trasferendo metà del materiale raccolto su piccoli dischi di vetro di 3 mm di diametro, che venivano immersi in 0,5 cm<sup>3</sup> di soluzione PGS addizionata di streptomycina; la porzione restante veniva strisciata su un vetrino portaoggetti per il controllo microscopico.

Il tentativo di isolamento venne fatto su tre uova. Le uova venivano osservate, dal 4° giorno in poi, due volte al giorno ed il passaggio cieco veniva effettuato da tutte le uova che morivano dal 6° al 9° giorno. Al 10° giorno di incubazione tutte le uova rimaste vive venivano aperte e da ciascuna di esse venivano effettuati, in caso di mancata evidenza di corpuscoli elementari, quattro passaggi ciechi consecutivi, dopo di che il tentativo di isolamento veniva abbandonato.

Per la colorazione degli strisci congiuntivali è stato adoperato il Giemsa (British Drug House); analogamente, per la colorazione degli strisci della membrana del tuorlo, è stato usato lo stesso colorante. La colorazione di Giemsa è stata preferita in quanto, contrariamente ad altri metodi di colorazione, permette di mettere in evidenza buona parte delle eventuali contaminazioni batteriche, da lieviti o da altri microorganismi.

Il metodo di Giemsa è stato impiegato secondo le modalità standard. Si è però constatato come la fissazione con alcool metilico risulti di maggior efficacia quando l'alcool viene fatto completamente evaporare e la soluzione di Giemsa, preparata nel rapporto 1:9 in tampone fosfato pH 7,2 in acqua distillata, viene aggiunta sul vetrino completamente essiccato. Il tempo di colorazione con il Giemsa può variare da un minimo di 45' a 3 ore o più: l'eccesso di colorazione in questi ultimi casi, viene allontanato dal successivo lavaggio del vetrino, per pochi secondi, in alcool etilico assoluto.

L'osservazione microscopica è stata effettuata con microscopio Zeiss mod. Standard attrezzato con il seguente corredo ottico: oculare K8x, obbiettivo a immersione 100/1,25 e lente additiva 1,3x. Il potere di riso-

---

(\*) Classificazione secondo Mc Callan.

TABELLA RIASSUNTIVA DEI RISULTATI OTTENUTI NELL'ISOLAMENTO

| Caso n.     | Stadio della malattia |                         | Età  | Inclusioni citoplasmatiche |             | Provenienza | Isolamento    |
|-------------|-----------------------|-------------------------|------|----------------------------|-------------|-------------|---------------|
|             | TR                    | II f + + p + +          |      |                            |             |             |               |
| Caso n. 1   | TR                    | II f + + p + +          | 10 a | +                          | (4/30') (*) | Asmara      | —             |
| Caso n. 2   | TR                    | II f + + p + +          | 9 a  | +                          | (4/30')     | Asmara      | —             |
| Caso n. 3   | TR                    | II f + + p + +          | 40 a | +                          | +           | Asmara      | +3° passaggio |
| Caso n. 4   | TR                    | II f + + + p +          | 8 a  | —                          | —           | Asmara      | —             |
| Caso n. 5   | TR                    | II f + + + p + +        | 8 a  | +                          | (4/30')     | Asmara      | —             |
| Caso n. 6   | TR                    | II f + + + p + +        | 7 a  | —                          | —           | Asmara      | +3° passaggio |
| Caso n. 7   | TR                    | II f + + + p + +        | 6 a  | +                          | (4/30')     | Asmara      | —             |
| Caso n. 8   | TR                    | II f + + p + +          | 6 a  | +                          | +           | Asmara      | +3° passaggio |
| Caso n. 9   | TR                    | II f + + + p + +        | 46 a | +                          | (2/30')     | Tigrà       | +2° passaggio |
| Caso n. 71  | TR                    | III f + p + + + c +     | 24 a | +                          | (2/30')     | Hamasién    | +1° passaggio |
| Caso n. 103 | TR                    | II f + + p + +          | 4 a  | +                          | (3/30')     | Hamasién    | +1° passaggio |
| Caso n. 108 | TR                    | III f + + p + + + c + + | 8 a  | +                          | +           | Adi Ugri    | +1° passaggio |

(\*) 4/30' sta a significare il numero delle inclusioni citoplasmatiche viste dopo 30 minuti di osservazione microscopica.

luzione di tale microscopio è ottimo e permette una chiara visualizzazione dei singoli corpuscoli elementari. (Nel corso dello studio è stato sperimentato l'inefficiente potere risolutivo, agli stessi ingrandimenti, di altri tipi di microscopi e la deficiente colorazione ottenuta con alcune soluzioni di Giemsa di altra provenienza).

Per i passaggi ciechi e per il passaggio dei corpuscoli elementari da uova infette, l'omogeneizzazione delle membrane del tuorlo è stata ottenuta agitando in contenitori con palline di vetro.

Come diluente è stata costantemente impiegata la soluzione PGS. Per il passaggio del virus si è impiegato un inoculum di 0,2 cm<sup>3</sup> di una sospensione 1/10 della SST (\*) 30% in PGS.

All'atto della raccolta delle membrane del tuorlo, supposte infette, queste, dopo averne effettuato uno striscio per semplice impressione, sono state trasferite in contenitori, aggiungendo parti eguali di PGS e congelate immediatamente in alcool assoluto mantenuto a -70° C. Tale congelamento rapido delle membrane è stato impiegato costantemente per tutto il periodo della ricerca.

Per il passaggio in serie dei corpuscoli elementari sono state impiegate esclusivamente membrane del tuorlo raccolte da uova rimaste vitali sino al momento della loro apertura.

Allorchè i ceppi si sono stabilizzati, tutte le uova ancora vive venivano aperte allorchè si raggiungeva una mortalità di circa il 50%. Le membrane raccolte, 10 a 10, venivano conservate a -70° C. I controlli batteriologici venivano fatti su agar sangue.

E' stato osservato che la maggior parte del virus muore se l'uovo, alla morte dell'embrione, non viene raccolto o per lo meno conservato a +4° C; a tale temperatura l'uovo può restare circa 18 ore senza una notevole perdita della attività del virus.

La coltivabilità del virus nelle uova non è costante, come giudicabile e dal numero dei corpuscoli elementari presenti nel campo microscopico e dal periodo di tempo necessario per ottenere la più elevata percentuale di mortalità tra le uova inoculate.

Nel ceppo prevalentemente impiegato per le ricerche (Tracoma 3/Asmara/1960) (\*) ad esempio, si è costantemente notata nei primi passaggi (4°, 5°, 6°) una elevata quantità di corpuscoli elementari (vedi foto) e la percentuale di mortalità massima delle uova si verificava al 5° giorno dalla inoculazione. Tale limite di tempo è andato gradualmente spostandosi verso il 6°, 7° ed 8° giorno, e, accanto a uova ricche di virus, si sono

(\*) SST = Sospensione del sacco del tuorlo.

(\*) Per contraddistinguere i nostri ceppi abbiamo impiegato la terminologia impiegata per il virus influenzale, specificando la provenienza del ceppo, l'anno di isolamento ed il numero di isolamento relativo a tale anno.

osservate uova in cui esso era assente o presente in relativamente scarsa quantità.

Allo scopo di ottenere abbondanti quantità di virus, è stato necessario ricorrere a passaggi ravvicinati facendo uso di materiale proveniente da precedenti esperimenti, anzichè aumentare la serie dei passaggi. Tale modalità è stata anche preferita nella eventualità che i passaggi successivi del virus, pur portando ad un maggiore adattamento al tipo di ospite impiegato, potessero, comunque, modificare la constatata patogenicità di esso per l'uomo e per un particolare tipo di scimmia e ciò in previsione di esperimenti di infezione provocata, da condursi in tali soggetti come « challenge » per saggiare l'efficacia della vaccinazione.

Nei primi cinque mesi della ricerca sono stati infatti effettuati soli 9 passaggi in serie.

La sospensione di corpuscoli elementari da impiegarsi per la ricerca sierologica, per la cutireazione e per la preparazione dei vaccini, è stata conservata come SST 50% in PGS a  $-70^{\circ}$  C.

Nel corso della coltivazione del virus si è notato come spesso l'embrione delle uova infette presentasse evidenti lesioni emorragiche sotto forma di petecchie e soffusioni: tali lesioni, comunque, sono state osservate anche nel caso di infezioni batteriche. La presenza eventuale di corpuscoli elementari è stata ricercata su vari segmenti dell'uovo embrionato (cute, membrana corio-allantoidea, liquido allantoideo ed amniotico, tuorlo) sempre con risultati negativi.

L'identificazione dei corpuscoli elementari isolati, quali agenti della malattia tracomatosa, si è basata sulla realizzazione dei postulati di Koch, nel senso che una malattia con tutti i caratteri attualmente riconosciuti dell'infezione tracomatosa di data recente, è stata trasmessa, con il virus coltivato, in volontari umani, con il reisolamento, dalle lesioni patologiche congiuntivali di questi, di corpuscoli elementari con caratteristiche identiche a quelli utilizzati per trasmettere la malattia; sul reperto di inclusioni citoplasmatiche, ritenute specifiche di tale infezione; sulla dimostrazione di un comune antigene solubile tra il virus isolato e i virus del gruppo ornitosi-linfogranuloma.

L'antigene solubile è stato estratto mediante trattamento fenolico e potenziato dal riscaldamento, secondo la tecnica di NIGG e HILLEMANN<sup>(8)</sup>. Sono stati impiegati sieri immuni da pazienti con infezione ornitotica e da cavie vaccinate con l'antigene solubile del virus ornitosico oltre a sieri di persone con infezione linfogranulomatosa di varia data.

*Patogenicità per l'uomo e per gli animali di laboratorio.*

## UOMO

La patogenicità per la congiuntiva umana, di uno dei virus isolati, è stata saggiata in due soggetti, instillando alcune gocce di una sospensione 50% in PGS al 4° passaggio, del virus Tracoma 3/Asmara/1960, avente un titolo di  $10^{-2,5}$  DIU<sub>50</sub>/0,2cc.

## EVOLUZIONE DELL'INFEZIONE SPERIMENTALE UMANA

| Caso | Età | 7° giorno                                                         | 13° giorno | 29° giorno                                                        | 36° giorno |
|------|-----|-------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------|------------|
| A.A. | 15  | f+<br>Inclusioni:<br>9/30'<br>Isolamento:<br>pos. 1° e.p. (*)     | f+ +       | f+ + p+ +<br>Inclusioni:<br>dubbio<br>Isolamento:<br>pos. 1° e.p. | f+ + p+ +  |
| K.Z. | 12  | f+ + p+ +<br>Inclusioni:<br>11/30'<br>Isolamento:<br>pos. 1° e.p. | f+ + p+ +  | f+ + p+ +<br>Inclusioni:<br>9/30'<br>Isolamento:<br>contaminato   | f+ + p+ +  |

vedi foto

(\*) e.p. = passaggio in uovo.

Il tentativo di isolamento del virus e la ricerca delle inclusioni citoplasmatiche nello striscio congiuntivale, eseguite dopo una settimana dalla inoculazione, ha dato in entrambi i soggetti, risultati positivi. Dopo 9 giorni dalla inoculazione, il virus è stato reisolato dal caso A. A. (il tentativo di isolamento del caso K. Z. è stato impedito da un inquinamento batterico): viceversa la ricerca delle inclusioni citoplasmatiche ha dato risultati positivi nel caso K. Z., dubbi nel caso A.A. (Precedentemente alla inoculazione sperimentale, le ricerche di inclusioni citoplasmatiche ed il tentativo di isolamento di corpuscoli elementari, in entrambi i soggetti, aveva dato risultati negativi). L'isolamento del virus nel corso della infezione sperimentale si è ottenuto sempre al primo passaggio in uovo. In ambedue i casi la malattia ha avuto un esordio acuto con edema palpebrale, congestione vascolare, secrezione mucosa, e mucopurulenta ed ipertrofia papillare.

## SCIMMIE

La patogenicità per le scimmie del ceppo di corpuscoli elementari Tracoma 3/Asmara/1960 è stata saggiata instillando alcune gocce del 5° passaggio di esso (sospensione 50% in PGS) sulla congiuntiva di due tipi di scimmia: 3 *Cercopithecus griseoviridis* e 3 *Cynocephalus babuin*. L'inoculum aveva un titolo di  $10^{-3}$  DIU<sub>50</sub>/0,2 cm<sup>3</sup>.

Non sono mai state notate, malgrado il lungo periodo di osservazione dello striscio, inclusioni citoplasmatiche simili a quelle della malattia umana. L'inizio della malattia non ha presentato caratteri di acuzie.

La ricerca preliminare di corpuscoli elementari coltivabili nel sacco del tuorlo di uova embrionate, ha dato risultati negativi in tutte le scimmie impiegate nell'esperimento.

### *Animali di laboratorio.*

I corpuscoli elementari del ceppo Tracoma 3/Asmara/1960 non sono risultati patogeni, al primo passaggio, per il topino adulto allorché inoculato per via cerebrale e endoperitoneale; per il topino lattante per via cerebrale e sottocutanea; per la cavia allorché inoculata per via endoperitoneale.

## APPENDICE

1. — E' stato saggiato l'eventuale potere emoagglutinante di una sospensione di virus ottenuta impiegando il ceppo SA1 (gentilmente inviatoci, insieme al ceppo SA2, dal dottor E. Murray dell'Università di Harvard, U.S.A.). Tale sospensione di virus, concentrata per centrifugazione e purificata mediante estrazione eterea, conteneva in un cm<sup>3</sup> l'equivalente di 2,5 g di sacco. La reazione condotta impiegando come diluente soluzione fisiologica a pH 6,6 ed una sospensione 1% di emazie lavate, ha dato risultati negativi sia a temperatura ambiente sia alle temperature di +4° C e di +35° C, in presenza di emazie delle seguenti specie animali: coniglio, topo, *Francolinus erkei*, cavallo, montone, pollo, piccione e cavia.

2. — La tossicità per il topo di una sospensione di virus attivo, è stata ricercata per il ceppo Tracoma 3/Asmara/1960, paragonando l'effetto ottenuto in tale animale a quello determinato con i due ceppi di

## ANDAMENTO DELLA MALATTIA SPERIMENTALE NELLE SCIMMIE E REPERTI DI LABORATORIO

| Animale                           | 9° giorno                                                                                       | 15° giorno                                                                              | 38° giorno                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Cercopitecus griseoviridis</i> | Congiuntivite follicolare<br>Isolamento: inquinato<br>Inclusioni: assenti                       | Congiuntivite follicolare<br>Isolamento: positivo al 2° p.<br>Inclusioni: assenti       | Congiuntivite follicolare<br>Isolamento: inquinato<br>Inclusioni: assenti      |
| <i>Cercopitecus griseoviridis</i> | Congiuntivite follicolare con emorragie<br>Isolamento: positivo al 1° p.<br>Inclusioni: assenti | Congiuntivite follicolare<br>Isolamento: positivo al 2° p.<br>Inclusioni: assenti       | Congiuntivite follicolare<br>Isolamento: inquinato<br>Inclusioni: assenti      |
| <i>Cynocephalus babuin</i>        | Congiuntivite con papille e follicoli<br>Isolamento: positivo al 1° p.<br>Inclusioni: assenti   | Congiuntivite follicolare lieve<br>Isolamento: positivo al 1° p.<br>Inclusioni: assenti | Congiuntivite follicolare<br>Isolamento: inquinato<br>Inclusioni: assenti      |
| <i>Cynocephalus babuin</i>        | Sano<br><br>Isolamento: negativo<br>Inclusioni: assenti                                         | Sano<br><br>Isolamento: negativo<br>Inclusioni: assenti                                 | Congiuntivite follicolare lieve<br>Isolamento: negativo<br>Inclusioni: assenti |
| <i>Cynocephalus babuin</i>        | Sano<br>Isolamento: negativo<br>Inclusioni: assenti                                             | Sano<br>Isolamento: negativo<br>Inclusioni: assenti                                     | Sano<br>Isolamento: negativo<br>Inclusioni: assenti                            |

corpuscoli elementari (SA1 e SA2) per i quali è già noto l'effetto letale prodotto al seguito della inoculazione endovenosa (\*).

Si è così constatato che, analogamente ai due ceppi citati, anche il ceppo da noi isolato, inoculato nella quantità di 0,3 cm<sup>3</sup> di una sospensione 50% di membrane in PGS, determina la morte del topo dopo 10 ore circa dalla inoculazione.

*Concentrazione e purificazione dei corpuscoli elementari.*

Sono stati sperimentati a questo scopo vari procedimenti basati principalmente sulla tripsinizzazione della sospensione di membrane, su centrifugazioni frazionate, su sostanze adsorbenti e su sostanze (fluorocarbonte ed etere) capaci di estrarre i materiali organici presenti nella sospensione bruta di corpuscoli elementari. Per ottenere infine una sospensione di corpuscoli elementari, sufficientemente monodispersa, è stato sperimentato l'effetto di onde ultrasonore a varia frequenza, applicate per differenti periodi di tempo.

*Situazione immunitaria nel corso della malattia naturale.*

Sono stati raccolti 430 sieri di persone di diversa età con infezione tracomatosa in varia fase di evoluzione. Solo una parte di essi è stata sinora studiata, allo scopo di determinare l'eventuale presenza di anticorpi specifici ed aspecifici relativi all'infezione tracomatosa.

A tale scopo sono state impiegate due reazioni serologiche: la reazione di fissazione del complemento e la reazione di microagglutinazione. La prima è stata eseguita utilizzando sia l'antigene solubile del virus ornitosico e quello estratto da sospensioni di *B. anitratum* <sup>(10)</sup>, sia l'antigene virale costituito da una sospensione purificata di corpuscoli elementari del ceppo Tracoma 3/Asmara/1960.

MATERIALI E METODI

*Antigene di gruppo ornitosico:* è stato impiegato un antigene commerciale (Italdiagnostic).

*Antigene solubile del *B. anitratum*:* è stato impiegato un antigene sperimentale gentilmente preparatoci dalla « Italdiagnostic ».

*Antigene virale per la reazione di fissazione del complemento:*

Sono state impiegate tre sospensioni di corpuscoli elementari, una parzialmente purificata e due purificate rispettivamente con Genetron e con etere.

Non è stata titolata l'attività fissante il complemento di tali sospensioni in presenza di un siero immune noto; ma la comparabilità dei valori ottenuti nella titolazione degli anticorpi si è basata sulla utilizzazione, per i tre tipi di antigene, di un'unica sospensione bruta di membrane 50%: la ricchezza in corpuscoli elementari dei tre antigeni è quindi da ritenersi analoga.

La reazione di fissazione del complemento è stata eseguita impiegando il metodo a goccia su piastre di plastica con incubazione a freddo

per 18h (<sup>11</sup>). Nella reazione sono state impiegate 2.5U di complemento e 4U di emolisina Wellcome. I risultati ottenuti, valutati in rapporto alla percentuale di emazie di montone non emolizzate, sono stati riferiti come 1, 2, 3, e 4 rispettivamente per indicare la presenza del 25, 50, 75 e 100 per cento delle emazie presenti, non emolizzate.

#### *Antigene virale per la reazione di microagglutinazione.*

A questo scopo è stata impiegata una sospensione purificata con etere, di corpuscoli elementari del ceppo Tracoma 3/Asmara/1960. La diluizione ottimale di corpuscoli, da impiegarsi nella reazione, è stata fissata di volta in volta in differenti preparazioni di antigene, in rapporto al numero di corpuscoli presenti nel campo microscopico. Sia un numero eccessivo che un numero scarso di questi, infatti, rendono meno chiara la lettura della reazione. Dal momento che la valutazione dei risultati di questa reazione si basa sul reperto di agglutinati di varia grandezza di corpuscoli elementari, è necessario che la sospensione virale impiegata, oltre che purificata, sia adeguatamente dispersa in modo che non si abbiano ammassi artificiosi di corpuscoli. A questo scopo sono stati impiegati con successo gli ultrasuoni con esposizioni di 5' a  $1\frac{1}{2}$  W/cm<sup>2</sup>. Dopo tale trattamento gli ammassi preesistenti di virus si dissolvono quasi completamente nei singoli corpuscoli elementari (<sup>13</sup>).

#### TECNICA

*Diluyente:* Data la precipitazione di sali che si verifica al momento della evaporazione dei reagenti e che rende parzialmente difficile la lettura dei risultati, viene impiegata come diluyente la soluzione PBS (<sup>12</sup>) al 50% in acqua distillata, addizionata di mertiolato alla concentrazione finale di 1:10000. L'aggiunta di un antisettico si rende necessaria per prevenire l'inquinamento che facilmente tende a verificarsi al momento della incubazione a temperatura ambiente dei reagenti.

*Apparecchiatura:* Vengono impiegate delle piastrine di vetro le cui caratteristiche sono dettagliatamente riferite altrove (<sup>13</sup>). Per una maggior rapidità di esecuzione della reazione, la distribuzione dei reagenti è stata effettuata con pipette di piccole dimensioni dello stesso calibro munite di tettarelle di gomma che lasciano cadere gocce del volume di 0,03 cm<sup>3</sup> circa.

Durante il periodo di incubazione le piastre che sostengono le gocce dei reagenti, vengono mantenute in una atmosfera umida, a tenuta di

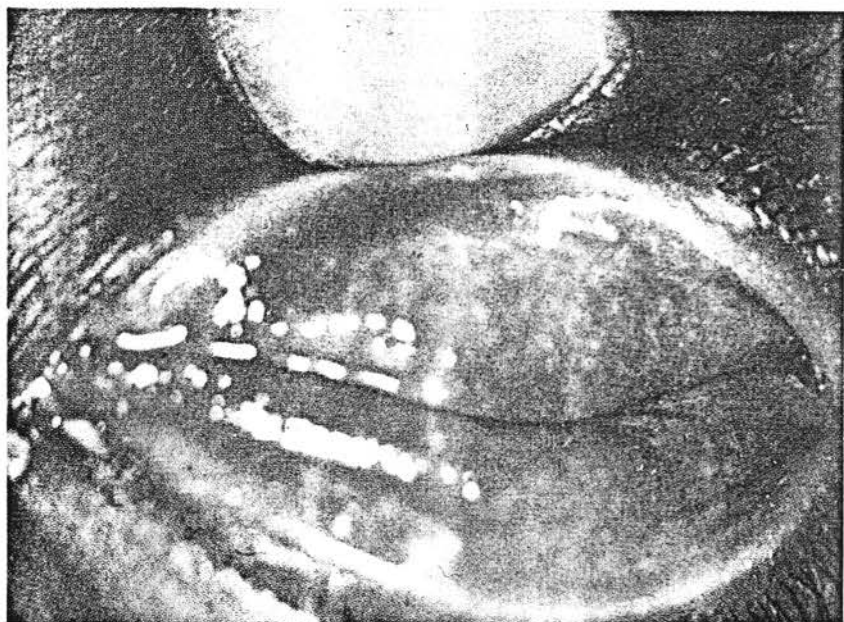


Fig. 1 — Congiuntivite tracomatosa umana sperimentale. Caso K. Z. in 10<sup>a</sup> giornata dall'infezione sperimentale.

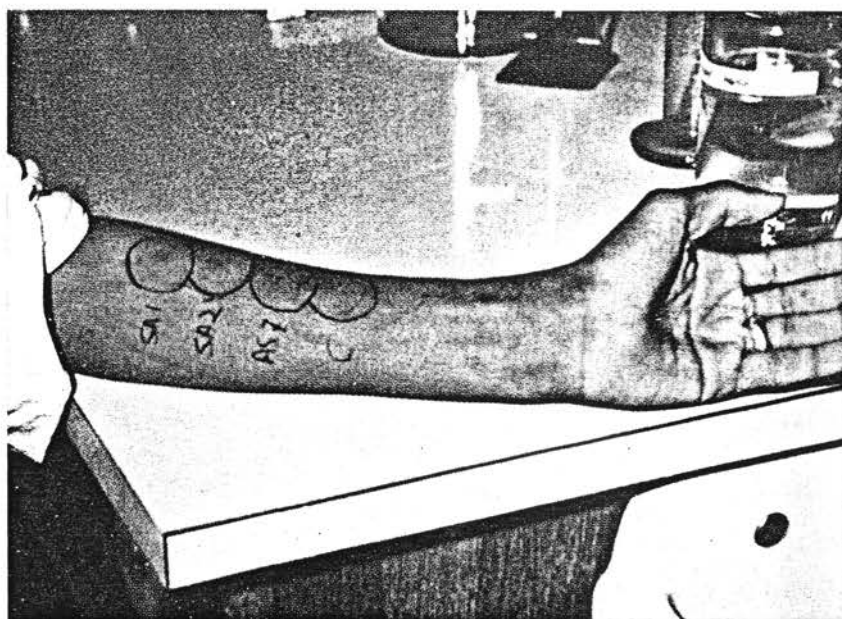


Fig. 2 — Reazione cutanea tracomatosa. Risposta comparativa dei tre antigeni impiegati e dell'antigene controllo.

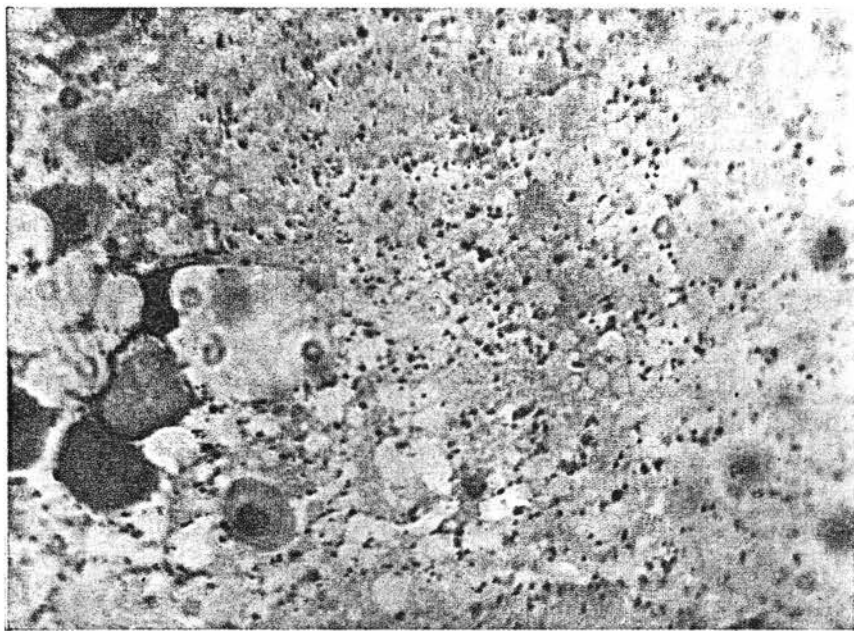


Fig. 3 — Striscio della membrana del tuorlo di un uovo infettato con il ceppo di corpuscoli elementari tracomatosi Asmara/3/1960. Corpuscoli elementari liberi. Colorazione di Giemsa. 1200 X.

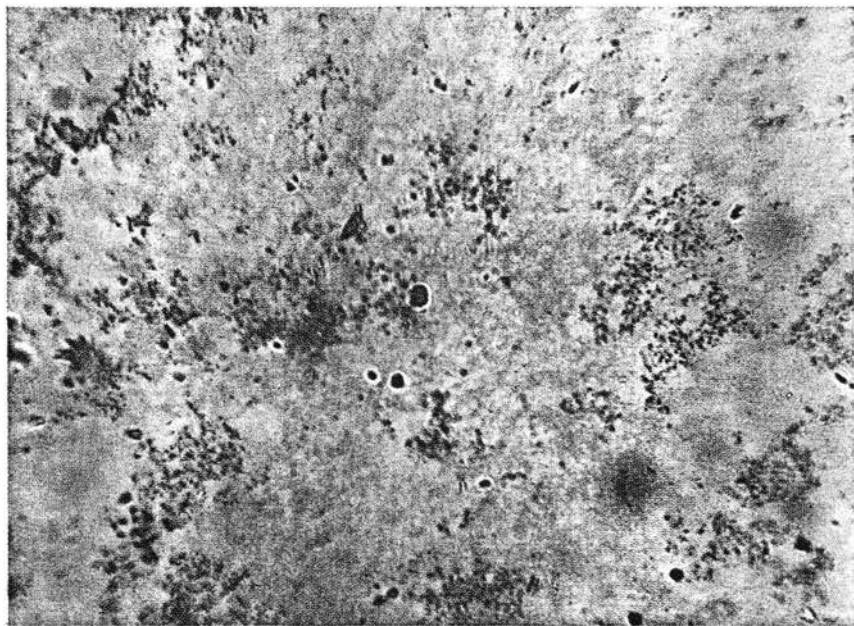


Fig. 4 — Reazione di microagglutinazione con i corpuscoli elementari tracomatosi. Reazione positiva. 500 X.

aria, realizzata con una qualsiasi copertura ermetica lasciando accanto alla piastra batuffoli di cotone imbevuti di acqua. E' necessario infatti che il volume delle gocce non si modifichi durante il periodo di incubazione.

#### ESECUZIONE DELLA REAZIONE

Le gocce contenenti le diluizioni del siero in esame, previamente inattivato a 56° C per 30', vengono disposte sulla piastra e su di esse viene aggiunta la goccia della sospensione di corpuscoli elementari. Si lascia incubare per 24h a temperatura ambiente. Dopo tale periodo le piastre vengono lasciate essiccare in termostato a 37° C. Quando le gocce sono completamente essiccate, la piastra viene fissata con alcool metilico e quindi colorata con il metodo di Giemsa. Il tempo di colorazione, in questo caso, non deve essere inferiore alle due ore, preferendosi una ipercolorazione degli agglutinati. La lettura degli agglutinati viene eseguita ad ingrandimenti di 400X.

Se la reazione è negativa, l'osservazione microscopica lascia solo intravedere uno strato rosato di materiale serico precipitato, sul quale sono scarsamente visibili i singoli corpuscoli elementari disseminati. Nel caso di una reazione positiva è netta la colorabilità particolare degli ammassi dei singoli corpuscoli elementari i quali, oltre che distintamente colorati, appaiono anche di maggiori dimensioni. Negli agglutinati i corpuscoli elementari sono trattenuti nelle maglie di una struttura che prende un colore rossastro. I corpuscoli elementari appaiono decisamente neri.

Il grado di agglutinazione può essere tale che non si apprezza più lo sfondo di materiale serico precipitato ed il campo microscopico presenta unicamente gli ammassi di virus. In caso di agglutinzioni intermedie, lo strato di materiale serico precipitato è discontinuo nei punti in cui si sono formati gli agglutinati. Questi ultimi tendono, in genere, ad ammassarsi al centro della superficie della goccia (vedi foto). L'intensità della reazione viene espressa con numeri arabi da 1 a 4 o con + sino a + + + + per indicare la presenza percentuale degli agglutinati.

Di fronte ad un inquinamento batterico, spesso la lettura dei risultati è ancora possibile. Una volta colorata, la piastra può essere osservata al microscopio anche dopo un discreto periodo di tempo, mantenendosi inalterata la morfologia del reperto microscopico.

Per il lavaggio le piastre vengono trattate prima con xilolo, quindi con alcool assoluto. Dopo lavaggio in acqua distillata vengono immerse per 10' in acqua bollente contenente un detersivo del commercio. Le pia-

stre vengono quindi lavate in acqua distillata nella quale vengono lasciate per 24h.

*Risultati* (Tavole 1, 2 e 3).

I dati sinora ottenuti vengono riferiti con la riserva che, essendo il numero delle osservazioni fatte ancora scarso, essi possano non rappre-

TAVOLA 1

Risultati ottenuti con sieri di pazienti con infezione tracomatosa, in presenza di vari antigeni e con differenti tecniche di reazione.

| Siero | OR | AN | TRE | TRG | TRN | RMA | Siero | OR | AN | TRE | TRG | TRN | RMA |
|-------|----|----|-----|-----|-----|-----|-------|----|----|-----|-----|-----|-----|
| 201   | 0  | 0  | 4   | 4   | 3   | 0   | 229   | 0  | 0  | 0   |     |     | 0   |
| 202   | 0  | 0  | 0   |     |     | 0   | 230   | 0  | 0  | 0   |     |     | 0   |
| 203   | 4  | 4  | 2   | 4   | 4   | 2   | 231   | 4  | 2  | 0   |     |     | 0   |
| 204   | 2  | 0  | 0   |     |     | 0   | 232   | 0  | 0  | 0   |     |     | 1   |
| 205   | 2  | 2  | 0   |     |     | 4   | 233   | 1  | 0  | 0   |     |     | 4   |
| 207   | 0  | 0  | 0   |     |     | 0   | 234   | 3  | 0  | 0   |     |     | 2   |
| 208   | 2  | 0  |     |     |     | 0   | 235   | 4  | 0  | 1   |     |     | 4   |
| 209   | 3  | 0  | 0   |     |     | 0   | 236   | 0  | 0  | 0   |     |     | 4   |
| 210   | 2  | 1  | 3   | 3   | 4   | 2   | 238   | 0  | 0  | 0   | 0   | 3   | 0   |
| 211   | 4  | 0  | 1   |     |     | 2   | 239   | 4  | 0  | 2   | 0   | 4   | 0   |
| 212   | 4  | 0  | 3   | 3   | 3   | 4   | 240   | 3  | 0  | 0   | 0   | 4   | 4   |
| 213   | 3  | 0  | 0   |     |     | 3   | 241   | 2  | 0  | 2   | 2   | 4   | 1   |
| 214   | 1  | 0  | 0   |     |     | 0   | 242   | 0  | 0  | 0   | 0   | 2   | 0   |
| 215   | 0  | 0  | 0   |     |     | 4   | 243   | 4  | 3  | 2   | 4   | 4   | 4   |
| 216   | 0  | 0  | 0   |     |     | 1   | 244   | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 2   |
| 217   | 0  | 0  | 3   | 0   | 1   | 0   | 245   | 4  | 0  | 0   | 0   | 4   | 1   |
| 218   | 4  | 2  | 0   |     |     | 0   | 246   | 4  | 0  | 4   | 3   | 4   | 3   |
| 219   | 4  | 0  | 2   | 3   | 3   | 3   | 247   | 4  | 4  | 4   | 0   | 4   | 2   |
| 220   | 4  | 0  | 2   | 4   | 4   | 4   | 248   | 4  | 4  | 4   | 3   | 4   | 4   |
| 221   | 3  | 0  | 0   |     |     | 0   | 249   | 1  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 222   | 0  | 0  | 0   |     |     | 4   | 250   | 0  | 0  | 0   | 0   | 3   | 0   |
| 223   | 0  | 0  | 0   |     |     | 0   | 251   | 3  | 1  | 1   | 0   | 4   | 3   |
| 224   | 0  | 0  | 0   |     |     | 2   | 252   | 4  | 3  | 3   | 4   | 4   | 1   |
| 225   | 3  | 0  | 0   |     |     | 0   | 255   | 1  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 226   | 4  | 0  | 0   |     |     | 3   | 256   | 0  | 2  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 227   | 0  | 0  | 2   | 0   | 0   | 1   | 257   | 4  | 0  | 2   | 4   | 4   | 0   |
| 228   | 4  | 2  | 0   |     |     | 2   | 258   | 4  | 4  | 4   | 4   | 4   | 0   |

Diluizione del siero 1:8 Positività totale di ciascun antigene: OR 63%; AN 24%; TRG 48%; TRE 37%; TRN 84%; RMA 53%. OR=Ornitosi; AN=B.anitratum; TRE=Tracoma estratto con etere; TRG=Tracoma estratto con genetron; TRN=Tracoma parzialmente purificato; RMA=Reazione di microagglutinazione. Come controllo dell'antigene TRN è stato impiegato tampone al veronal e non una analoga sospensione parzialmente purificata di membrane del tuorlo di uova normali: riteniamo quindi che l'elevata percentuale di positività ottenuta con questo antigene possa essere in parte di natura aspecifica. In un secondo gruppo di sieri la reazione di fissazione del complemento con l'antigene solubile ornitosico ci ha dato una percentuale di positività del 82%.

Andamento comparativo della reazione di microagglutinazione e di fissazione del complemento a seconda delle varie fasi di evoluzione della malattia tracomatosa.

| DILUIZIONE DEL SIERO 1:8                                    |     |    |    |                                                             |     |    |    |                                                             |     |    |    |
|-------------------------------------------------------------|-----|----|----|-------------------------------------------------------------|-----|----|----|-------------------------------------------------------------|-----|----|----|
| Tracoma II                                                  |     |    |    | Tracoma III                                                 |     |    |    | Tracoma IV                                                  |     |    |    |
| Siero                                                       | RMA | OR | AN | Siero                                                       | RMA | OR | AN | Siero                                                       | RMA | OR | AN |
| 3                                                           | 4   | 2  | 0  | 30                                                          | 3   | 0  | 0  | 42                                                          | 3   | 3  | 0  |
| 6                                                           | 2   | 0  | 0  | 34                                                          | 4   | 4  | 4  | 60                                                          | 1   | 0  | 1  |
| 8                                                           | 4   | 1  | 1  | 44                                                          | 3   | 2  | 0  | 62                                                          | 3   | 2  | 0  |
| 53                                                          | 4   | 4  | 0  | 54                                                          | 2   | 2  | 0  | 74                                                          | 3   | 4  | 4  |
| 86                                                          | 4   | 0  | 0  | 55                                                          | 3   | 4  | 4  | 97                                                          | 3   | 0  | 0  |
| 90                                                          | 2   | 0  | 1  | 57                                                          | 4   | 2  | 1  | 99                                                          | 2   | 0  | 0  |
| 111                                                         | 2   | 3  | 3  | 78                                                          | 4   | 4  | 0  | 100                                                         | 2   | 0  | 1  |
| 131                                                         | 2   | 3  | 2  | 88                                                          | 2   | 0  | 0  | 101                                                         | 4   | 3  | 0  |
|                                                             |     |    |    | 92                                                          | 3   | 2  | 0  | 102                                                         | 4   | 4  | 4  |
|                                                             |     |    |    | 108                                                         | 3   | 4  | 0  | 103                                                         | 2   | 0  | 0  |
|                                                             |     |    |    |                                                             |     |    |    | 106                                                         | 2   | 0  | 2  |
| Totale dei sieri esaminati con la RMA 31: positivi 23 (74%) |     |    |    | Totale dei sieri esaminati con la RMA 36: positivi 30 (83%) |     |    |    | Totale dei sieri esaminati con la RMA 39: positivi 33 (89%) |     |    |    |

sentare, nelle percentuali riferite, la effettiva situazione anticorpale media della totalità dei sieri da noi raccolti (430).

La specificità delle reazioni è stata controllata impiegando un immunisiero anti-antigene ornitosico ottenuto in cavie (tre iniezioni contemporanee, sottocute, in tre punti diversi, di 0,5 cm<sup>3</sup> di antigene non diluito, seguite da richiamo endoperitoneo di 1 cm<sup>3</sup> dopo 14 giorni: salasso 7 giorni dopo), un antisiero antiornitosi umano e 4 sieri di individui esenti da infezione tracomatosa clinicamente rilevabile (Europei) e 5 sieri di soggetti con infezione linfogranulomatosa di varia data.

Sia la reazione di microagglutinazione che di deviazione del complemento con l'antigene virale tracomatoso hanno dato, con tutti i sieri riferiti, risultati negativi.

Come appare dalla tabella presentata, la deviazione del comple-

Reazione di microagglutinazione quantitativa con sieri di soggetti in varia fase di malattia.

| Siero | Tracoma II<br>Diluizioni scalari del siero |      |      |      | Tracoma III<br>Diluizioni scalari del siero |      |      |      | Tracoma IV<br>Diluizioni scalari del siero |      |      |      |
|-------|--------------------------------------------|------|------|------|---------------------------------------------|------|------|------|--------------------------------------------|------|------|------|
|       | 1:8                                        | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:8                                         | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:8                                        | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| 2     | ++                                         | +    | 0    | 0    | 30+++                                       | +++  | 0    | 0    | 42++++                                     | ++   | 0    | 0    |
| 3     | +++                                        | ++   | +++  | +    | 34++++                                      | ++   | ++   | 0    | 62++                                       | +    | +++  | ++   |
| 4     | ++                                         | ++   | +    | +    | 52++++                                      | ++++ | ++   | 0    | 74+                                        | +++  | 0    | 0    |
| 5     | ++                                         | +    | ++   | 0    | 54++                                        | +    | 0    | 0    |                                            |      |      |      |
| 8     | ++                                         | ++   | ++   | ++   | 69 0                                        | ±    | ±    | 0    |                                            |      |      |      |
| 53    | +++                                        | +++  | +    | 0    | 92++                                        | 0    | 0    | 0    |                                            |      |      |      |
| 86    | +++                                        | ++   | 0    | 0    | 198++++                                     | ++   | +++  | +    |                                            |      |      |      |
| 93    | ±                                          | 0    | 0    | 0    |                                             |      |      |      |                                            |      |      |      |
| 163   | ++                                         | ++   | ±    | 0    |                                             |      |      |      |                                            |      |      |      |
| 226   | +                                          | 0    | 0    | 0    |                                             |      |      |      |                                            |      |      |      |
| 208   | +++                                        | +    | +    | +    |                                             |      |      |      |                                            |      |      |      |

Totale dei sieri esaminati 26: positivi 24 (76%).

mento con l'antigene di gruppo ornitosico, ha dato in due successive occasioni positività percentuali del 63 e del 53%. La reazione di deviazione del complemento con l'antigene virale ottenuto con l'impiego di etere e fluorocarbene ci ha dato rispettivamente una positività percentuale del 37 e del 48%. La reazione di microagglutinazione infine, ci ha dato, su 4 gruppi diversi di sieri, positività percentuali del 74, 83, 89 e 53%. Non si sono avute con questa reazione differenze molto evidenti nel titolo e nella percentuale di positività tra sieri prelevati da soggetti con malattia in varia fase di evoluzione.

La reazione di microagglutinazione con diluizioni del siero inferiori ad 1:8, dà in genere risultati difficilmente leggibili: nel corso della titolazione degli anticorpi con questa reazione si è spesso notata la presenza di un andamento paradossale dell'entità degli agglutinati, nel senso che diluizioni maggiori del siero presentavano una maggiore quantità di agglutinati.

#### CUTIREAZIONE

Questa reazione è stata eseguita sulla intera popolazione infantile e giovanile di un villaggio (230 persone) e su un gruppo di persone, degenti per infezioni oculari, presso la Clinica Oculistica dell'Università di Roma.

Antigeni e tecnica impiegata.

*Antigeni:* Sono stati usati i seguenti ceppi di corpuscoli elementari tracomatosi: il ceppo SA1, il ceppo SA2 ed il ceppo Tracoma 3/Asmara/1960. Le sospensioni impiegate nella prova sono state purificate con etere. La titolazione della reattività dell'antigene è stata eseguita in individui con tracoma attivo (fase II) impiegando due diluizioni dell'originale SST 100%: diluizioni al 10% ed al 5%, in soluzione fisiologica. Come controllo sono state impiegate analoghe diluizioni percentuali di SST 100% purificate in modo analogo, di membrane di uova sane in 14ª giornata di sviluppo.

*Tecnica:* L'iniezione è stata fatta con aghi per iniezioni intradermiche producendo dei ponfi di circa 0,3 cm di diametro.

La lettura della titolazione preliminare degli antigeni da impiegarsi nella reazione è stata effettuata rispettivamente dopo 24 e 48 h. Gli effetti della cutireazione risultano più evidenti dopo 24 h: i risultati riferiti indicano appunto la lettura eseguita dopo tale periodo di tempo. La reazione provocata dall'antigene alla concentrazione del 5%, pur essendo leggermente inferiore a quella dell'antigene più concentrato, è comun-

que apparsa nettamente evidente, per cui tale concentrazione è stata impiegata nelle successive prove di massa.

In ciascuna lettura è stata valutata l'intensità dell'eritema e quella del ponfo, riferendo la prima con valori da 1 a 3 a seconda della estensione dell'eritema (da alcuni mm. a 2 cm. ca.). A volte il grado dell'eritema e del ponfo è stato tale da aversi la formazione di un'unica chiazza eritemato-ponfoide che copriva la zona di inoculazione dei tre antigeni (vedi foto).

Come è stato precedentemente accennato, ambedue i ceppi SA1 e SA2 risultano letali per il topo adulto, allorché inoculati per via endovenosa. BELL ed al. (14), in base a prove di tossiimmunizzazione (la vaccinazione con corpuscoli elementari omotipici previene l'effetto letale provocato dallo stesso ceppo di corpuscoli elementari) hanno dimostrato che i due ceppi citati risultano tossigenicamente diversi. Per questa ragione è stata decisa l'utilizzazione contemporanea di tali ceppi e del ceppo locale Tracoma 3/Asmara/1960.

#### RISULTATI DELLA PROVA CUTANEA

|                         | Stadio della malattia |           |           | Casi sani<br>(Roma) |
|-------------------------|-----------------------|-----------|-----------|---------------------|
|                         | TR II                 | TR III    | TR IV     |                     |
| Soggetti esaminati . .  | 92                    | 109       | 45        | 30                  |
| Soggetti negativi . .   | 4%                    | 8%        | 13%       | 46%                 |
| Reattività dubbia . .   | 5%                    | 14%       | 11%       | 13%                 |
| Soggetti reattivi . .   | 91% (e+p)             | 78% (e+p) | 76% (e+p) | 40% (e)             |
| Reattività spiccata . . | 74% (e+p)             | 62% (e+p) | 48% (e+p) | 10% (e+i)           |

e = eritema  
p = ponfo

Sono stati saggiati inoltre, nello stesso villaggio, un soggetto sano con risultati negativi e tre soggetti con tracoma dubium: di questi, uno è risultato negativo e due positivi.

In totale si è avuta una reattività per l'antigene controllo pari all'8% dei casi presi in considerazione: in tutti i casi questa è stata di scarsa entità.

Non si sono notate differenze significative nella intensità delle risposte verso i tre antigeni impiegati.

## VACCINAZIONE

Le ricerche sulla vaccinazione sono state iniziate con i seguenti scopi: ottenere una sospensione di corpuscoli elementari, sufficientemente purificata in modo da poter essere impiegata nell'uomo; valutare la innocuità nell'uomo e negli animali di laboratorio di tale preparazione; valutare l'efficacia, comparando i risultati di tre differenti preparazioni di vaccino, considerando: 1) la capacità di essi nel suscitare un movimento immunitario, sia in zone con endemicità tracomatosa che in zone esenti da tracoma; 2) l'efficacia nel modificare l'evoluzione clinica della malattia naturale in atto; 3) l'efficacia nel prevenire l'infezione indotta sperimentalmente.

### *Preparazione e costituzione dei vaccini.*

*Vaccino in fase acquosa.* Sospensione di corpuscoli elementari purificati, in soluzione fisiologica, equivalente, al 100% SST (prima iniezione 1 cm<sup>3</sup>) ed al 50% SST (iniezione di richiamo dopo 30 gg. circa).

*Vaccino con coadiuvante all'idrossido di alluminio.* Sospensione a parti eguali di corpuscoli elementari in soluzione fisiologica concentrati e purificati, e di idrossido di alluminio (18 mg/cm<sup>3</sup>), in modo di avere una concentrazione finale pari al 200% SST. (Prima iniezione 0,5 cm<sup>3</sup>, richiamo con 1 cm<sup>3</sup> di vaccino acquoso 50% SST, dopo 40 gg. ca. Dopo aver unito i due componenti la miscela viene agitata a mano per alcuni minuti e lasciata 24 h a +4° C.

*Vaccino con coadiuvanti oleosi.* Sospensione a parti eguali di corpuscoli elementari, concentrati e purificati in soluzione fisiologica e di coadiuvanti oleosi (Arlacel A, 1 parte, Bayol F, 9 parti), in modo di avere una concentrazione finale pari al 200% di SST. (Prima iniezione 0,5 cm<sup>3</sup>, richiamo con 1 cm<sup>3</sup> di vaccino acquoso 50% SST dopo 44 gg. ca.).

L'omogeneizzazione viene effettuata con un agitatore meccanico sino ad ottenere una emulsione stabile.

Ciascuno di questi vaccini è stato preparato partendo da un unico pool di SST, per cui la concentrazione in corpuscoli elementari di quantità equivalenti dei vari vaccini, si deve ritenere eguale.

Ciascun vaccino contiene formalina alla concentrazione finale di 0,02 per cento.

### *Prove di innocuità.*

Sono state inoculate 40 cavia per via endoperitoneale, con 1 cm<sup>3</sup> dei vari vaccini, senza notare alcun effetto dannoso.

L'inoculazione intramuscolare profonda di 0,5 cm<sup>3</sup> di vaccino oleoso o di vaccino adsorbito su idrossido di alluminio e di 1 cm<sup>3</sup> di vaccino acquoso nella scimmia, non determina nessuna alterazione né locale né generale. Un analogo dosaggio, per via intramuscolare, nell'uomo, risulta assolutamente innocuo.

## RISULTATI

### 1. *Prevenzione*

#### Uomo

I risultati ottenuti sono raccolti nelle tabelle A e B.

Sono stati scelti soggetti con infezione tracomatosa spenta o con lieve reazione papillare. L'infezione sperimentale è stata ottenuta con l'instillazione di 1 goccia di una sospensione di membrane infette, in PGS, avente un titolo di  $10^{-2.5}/0,2$  cm<sup>3</sup>. Al momento dell'infezione sperimentale i vari gruppi di soggetti erano rispettivamente a 60 gg. (gruppo del vaccino acquoso (gruppo del vaccino oleoso e del vaccino con idrossido di alluminio) e 70 gg. dall'inizio della vaccinazione.

In ciascun caso è stato effettuato uno striscio congiuntivale e tentato il reisolamento del virus a distanza di 7 gg. dall'infezione. L'evoluzione dell'infezione sperimentale è stata quindi controllata al 14° e 21° giorno.

La presenza dei segni generici di una congiuntivite acuta, senza segni di specificità (riferita con la lettera C) ha reso impossibile una valutazione dei risultati in 7ª giornata dall'infezione, valutazione basata sulla comparsa degli elementi specifici (f = follicoli) e della reazione papillare (p = papille).

L'età media delle persone vaccinate è stata di 18 anni per i tre gruppi vaccinati, e di 11 anni per il gruppo controllo.

La comparsa dei segni di una congiuntivite acuta aspecifica è stata seguita, eccetto in un caso, dalla comparsa dei segni specifici dell'infezione. La comparsa di inclusi (1/30') è stata osservata in due casi in assenza dei segni specifici della malattia: in uno di questi due casi è stato anche ottenuto il reisolamento del virus (caso 23).

Nelle condizioni di esperimento, la maggior attività protettiva è stata ottenuta con il vaccino acquoso.

Tutti i casi in cui si è ottenuta l'infezione sperimentale, sono stati trattati, alla fine dell'esperimento, con antibiotici e dimessi, completamente guariti.

| Caso n.                        | A 7 giorni dalla infezione sperimentale |               |                                  | A 14 gg.             | A 21 gg.             |
|--------------------------------|-----------------------------------------|---------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
|                                | Quadro clinico                          | Isolam. virus | Inclusi sullo striscio congelate |                      |                      |
| Vaccino con coadiuvanti oleosi |                                         |               |                                  |                      |                      |
| 3                              | c + + +                                 | pos. 1° pass. | 9/30'                            | f + + + p + + +      | f + + p + +          |
| 4                              | NN                                      | neg.          | 0/30'                            | NN                   | NN                   |
| 5                              | c + +                                   | cont.         | 2/30'                            | f + p + + +          | f + p + + +          |
| 7                              | c +                                     | neg.          | 30/30'                           | f + p + + +          | f + p + + +          |
| 14                             | NN                                      | neg.          | 0/30'                            | NN                   | NN                   |
| 15                             | NN                                      | neg.          | 0/30'                            | NN                   | NN                   |
| 16                             | c +                                     | pos. 1° pass. | 3/30'                            | f + + + p + + + (00) | f + + + p + + + (00) |
| 21                             | c + +                                   | pos. 1° pass. | 10/30'                           | f + + p + +          | f + + + p + +        |
| 11                             | f + p + +                               | pos. 1° pass. | 1/30'                            | f + + p + +          | f + + p + +          |
|                                |                                         |               |                                  | Protetti 3/9 (33%)   | 3/9 (33%)            |
| Controlli non vaccinati        |                                         |               |                                  |                      |                      |
| 31                             | c +                                     | pos. 1° pass. | 13/30'                           | f + + p + +          | f + + p + +          |
| 32                             | f + + p + +                             | neg.          | 2/30'                            | dimesso              | dimesso              |
| 33                             | c + +                                   | pos. 1° pass. | 33/30'                           | f + + p + +          | f + + + p + + +      |
| 34                             | f + p + +                               | pos. 1° pass. | 15/30'                           | f + p + +            | f + p + +            |
| 35                             | f + +                                   | neg.          | 0/30'                            | f +                  | f +                  |
| 36                             | f + + p + +                             | pos. 1° pass. | 56/30'                           | f + + p + + (00)     | f + + p + + (00)     |
| 41                             | c + + +                                 | pos. 1° pass. | 12/30'                           | f + + p + +          | f + p + + +          |
| 60                             | f + +                                   | neg.          | 0/30'                            | dimesso              | dimesso              |

Abbreviazioni: NN = assenza di segni di infezione;

f = follicoli;

p = papille;

c = congestione congiuntivale;

cont. = isolamento inquinato da germi;

(00) = infezione diffusa anche all'occhio non inoculato.

TABELLA B

ESPERIMENTO DI VACCINAZIONE UMANA SEGUITO DA INFEZIONE SPERIMENTALE

| Caso n.                                   | A 7 giorni dalla infezione sperimentale |               |                                | A 14 gg.           |                | A 21 gg.      |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|--------------------------------|--------------------|----------------|---------------|
|                                           | Quadro clinico                          | Isolam. virus | Inclusi sullo striscio cong.le | Quadro clinico     | Quadro clinico |               |
|                                           |                                         |               |                                |                    |                |               |
| <i>Vaccino acquoso</i>                    |                                         |               |                                |                    |                |               |
| 23                                        | c +                                     | pos. 1° pass. | 1 30'                          | c +                |                | c +           |
| 24                                        | c + + +                                 | pos. 4° pass. | 2/30'                          | f + p + +          |                | f + p + +     |
| 26                                        | f + + p + +                             | neg.          | 0 30'                          | f + + p + +        |                | f + + p + +   |
| 27                                        | NN                                      | neg.          | 0/30'                          | NN                 |                | NN            |
| 28                                        | NN                                      | neg.          | 1 30'                          | NN                 |                | NN            |
| 29                                        | c ±                                     | neg.          | 0/30'                          | c ±                |                | NN            |
| 30                                        | NN                                      | neg.          | 0/30'                          | NN                 |                | NN            |
|                                           |                                         |               |                                | Protetti 5/7 (71%) |                | 5/7 (71%)     |
| <i>Vaccino all'idrossido di alluminio</i> |                                         |               |                                |                    |                |               |
| 1                                         | NN                                      | neg.          | 0/30'                          | NN                 |                | NN            |
| 5                                         | c +                                     | cont.         | 18 30'                         | f + p + +          |                | f + p + +     |
| 2                                         | c + +                                   | cont.         | 3 30'                          | f + + + p + +      |                | f + + + p + + |
| 8                                         | NN                                      | cont.         | 0/30'                          | NN                 |                | NN            |
| 12                                        | c +                                     | pos. 4° pass. | 4 30'                          | f + + p + +        |                | f + +         |
| 13                                        | NN                                      | neg.          | 0 30'                          | NN                 |                | NN            |
| 17                                        | NN                                      | cont.         | 0 30'                          | NN                 |                | NN            |
| 19                                        | c + +                                   | pos. 1° pass. | 0 30'                          | f + + p + +        |                | f + p + +     |
| 20                                        | c + + +                                 | neg.          | 2 30'                          | f + + p + +        |                | f + + p + +   |
|                                           |                                         |               |                                | Protetti 4/9 (44%) |                | 4/9 (44%)     |

Abbreviazioni: c = congestione congiuntivale;

f = follicoli;

p = papille;

cont. = isolamento contaminato da germi;

NN = assenza di segni di infezione.

SCIMMIA (*Cercopithecus griseoviridis*)

I risultati ottenuti sono raccolti nella tabella C.

In ciascun animale è stato tentato l'isolamento del virus dopo 12 giorni dall'infezione sperimentale. L'evoluzione della infezione è stata controllata dopo 12, e 25 giorni. L'infezione è stata trasmessa instillando una goccia di una sospensione di membrane del tuorlo in PGS, avente un titolo di  $10^{-2}$  DIU<sub>50</sub>/0,2 cm<sup>3</sup>.

In tutti i casi l'esordio della malattia ha mancato di quei caratteri di acuzie presenti nell'infezione umana. I segni clinici di una congiuntivite aspecifica sono stati seguiti in sei casi su nove dalla comparsa di follicoli. Solo il 63% degli animali utilizzati come controlli hanno presentato la malattia. Sfortunatamente tre degli animali utilizzati a questo scopo sono deceduti per enterite acuta nell'intervallo tra le due osservazioni, per cui non abbiamo avuto la possibilità di conoscere l'evoluzione successiva della congiuntivite aspecifica osservata dopo 12 gg. dall'infezione.

2. Potere immunizzante dei tre tipi di vaccino impiegati in uomo e in scimmia. Questa ricerca è ancora in corso.

3. Esperimenti di vaccinoterapia. Sono stati selezionati in quattro villaggi 400 bambini con infezione tracomatosa di analoga intensità. Per ciascun villaggio 50 bambini sono stati vaccinati (25 con vaccino oleoso e 25 bambini con vaccino adsorbito su idrossido di alluminio) e 50 lasciati come controllo.

Le modalità di vaccinazione ed il dosaggio sono state simili a quelle impiegate nell'esperimento di prevenzione.

I risultati ottenuti sono raccolti nella seguente tabella.

RISULTATI DELL'ESPERIMENTO DI VACCINOTERAPIA  
DOPO DUE MESI DALLA VACCINAZIONE

|                      | Vaccino<br>con coadiuvanti oleosi | Vaccino con<br>coadiuvanti all' Al(OH) <sub>3</sub> | Controlli |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| Clinicamente guariti | 58%                               | 19%                                                 | 0         |
| » migliorati         | 13%                               | 42%                                                 | 10%       |
| » stazionari         | 26%                               | 30%                                                 | 80%       |
| » peggiorati         | 0                                 | 8%                                                  | 10%       |

TABELLA C

VACCINAZIONE NELLA SCIMMIA SEGUITA DA INFEZIONE SPERIMENTALE

| Caso n.                                   | A 12 gg.             | A 25 giorni | Caso n. | A 12 gg.                | A 25 giorni |
|-------------------------------------------|----------------------|-------------|---------|-------------------------|-------------|
| <i>Vaccino acquoso</i>                    |                      |             |         |                         |             |
| 36                                        | f + +                | f ±         | 21      | C +                     | f +         |
| 38                                        | NN                   | f + +       | 27      | f + +                   | f + +       |
| 39                                        | f + + +              | f + +       | 30      | NN                      | NN          |
| 41                                        | f + +                | morta       | 31      | f + + +                 | f +         |
| 42                                        | NN                   | NN          | 32      | f + +                   | f +         |
| 47                                        | f + +                | f ±         | 33      | C +                     | f + +       |
| 51                                        | f + +                | f +         | 34      | f +                     | morta       |
| 52                                        | C +                  | f +         |         |                         |             |
| 50                                        | f + +                | f ±         |         | Protette 3/9 (33%)      | 4/6 (16%)   |
| <i>Vaccino all'idrossido di alluminio</i> |                      |             |         |                         |             |
| <i>Controlli</i>                          |                      |             |         |                         |             |
| 1                                         | NN                   | f + +       | 1       | f +                     | f + +       |
| 2                                         | C + +                | f + +       | 2       | C +                     | NN          |
| 3                                         | NN                   | NN          | 3       | f + + + (pos. 1° pass.) | f +         |
| 4                                         | C +                  | f ±         | 60      | C + +                   | morta       |
| 5                                         | NN                   | f +         | 61      | C +                     | morta       |
| 7                                         | NN                   | NN          | 62      | f +                     | morta       |
| 8                                         | f + +                | f + +       | 63      | f +                     | f + +       |
| 9                                         | C +                  | NN          | 64      | f + + +                 | f + + +     |
| 10                                        | f +                  | NN          |         |                         |             |
| 11                                        | C +                  | NN          |         | Infette 5/8 (63%)       |             |
| 13                                        | C +                  | f +         |         |                         |             |
| 14                                        | f + +                | f + +       |         |                         |             |
| 16                                        | NN                   | NN          |         |                         |             |
| 17                                        | f + + + (+1° pass.)  | f + + +     |         |                         |             |
|                                           | Protette 10/14 (71%) | 6/14 (43%)  |         |                         |             |

COMMENTO

1. *Isolamento e identificazione dei corpuscoli elementari quali agenti dell'infezione tracomatosa.*

La coltivabilità del virus del tracoma come giudicabile dalla moltiplicazione dei corpuscoli elementari, è senza dubbio dipendente da numerosi fattori, per la maggior parte sconosciuti. La patogenicità stessa del virus per l'uovo embrionato, riferita sia alla morte che alla comparsa di lesioni emorragiche a carico dell'embrione, presenta aspetti di difficile valutazione.

Nel corso della nostra esperienza si è ottenuto, in tre casi, l'isolamento del virus dopo 4 passaggi ciechi, il che fa supporre che impiegando una tecnica non adeguata, il virus stenti, anche attraverso numerosi passaggi, a raggiungere concentrazioni limite capaci di produrre una infezione estesa delle cellule delle membrane del tuorlo. D'altra parte la stessa capacità del virus a riprodursi nell'uovo embrionato, varia probabilmente in rapporto alla qualità delle uova impiegate, avendo osservato per lunghi periodi una scarsa coltivabilità da parte di passaggi di virus che in altri periodi hanno dimostrato una netta capacità riproduttiva. Un forte indebolimento di quest'ultima è stato in genere osservato verso l'8°-9° passaggio successivo, ma è stato difficile giudicare il successivo comportamento dei ceppi in quanto in alcuni casi si è avuto un improvviso ritorno ad una elevata infettività.

Concludendo, l'esperienza finora fatta al riguardo ci ha maturati nella convinzione che la coltivazione del virus, soprattutto a scopo industriale, presenta notevoli difficoltà pratiche, tanto da farci prendere in seria considerazione, l'utilizzazione di altri possibili metodi di coltura.

Le lesioni a carico dell'embrione di pollo inoculato, dalla comparsa di lesioni emorragiche alla morte di questo, non sono sempre in rapporto con la quantità di virus presente nell'uovo. In numerose occasioni abbiamo constatato quantità notevoli di virus in assenza di lesioni rilevabili a carico dell'uovo embrionato. La capacità del virus a produrre la morte dell'uovo dipende quindi, probabilmente da altri fattori (tossici?) oltre che dall'entità della riproduzione dei corpuscoli elementari.

Il reperto ed il numero delle inclusioni citoplasmatiche sono senza dubbio in relazione diretta con la possibilità di ottenere l'isolamento di corpuscoli elementari, comunque eccezioni in un senso o nell'altro sono possibili. (Nella nostra esperienza il virus è stato isolato da casi senza inclusioni e non è stato isolato, invece, da casi con elevato numero di inclusioni). In condizioni di infezione sperimentale, la comparsa di in-

clusi 1/30' è stata osservata in due casi in assenza di malattia: in uno di questi (caso 23 tabella B) è stato isolato il virus al primo passaggio in uovo.

## 2. *Patogenicità per l'uomo e per gli animali di laboratorio.*

Nelle condizioni di esperimento riferite, la patogenicità del ceppo di corpuscoli elementari studiati, per l'uomo è stata sempre elevata ottenendosi nei due successivi esperimenti una positività pari al 100%, impiegando un inoculum di 120 ca. DIU<sub>50</sub>.

La malattia è sempre esordita in modo acuto dopo una fase di incubazione variabile da 2 a quattro giorni. In ogni caso la comparsa di lesioni specifiche (follicoli) è stata preceduta e forse mascherata, in alcuni casi, dalla presenza di segni clinici di una flogosi congiuntivale acuta aspecifica rappresentata da edema, congestione, intensa ipertrofia papillare, secrezione mucosa e mucopurulenta ed edema palpebrale, tanto che una diagnosi specifica di malattia poteva essere posta soltanto al regredire di questa sintomatologia iniziale.

Per quanto riguarda l'interpretazione di questi fenomeni riteniamo che possa essere presa in considerazione una probabile patogenesi allergo-tossica. La presenza di una componente tessutale locale potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che l'esordio della malattia nella scimmia inferiore è invece caratterizzato, nella nostra esperienza, dalla assoluta mancanza di fenomeni acuti.

Concludendo, l'effetto della inoculazione di virus attivo, nei casi da noi studiati, tutti già venuti verosimilmente in contatto con la infezione tracomatosa, esprime probabilmente la somma di due fatti di cui uno di natura allergica, equivalente alle manifestazioni reattive cutanee e l'altro dovuto ad un effetto tossico immediato della sospensione di virus attivo. La specie umana è comunque sensibile anche alla seconda componente, mentre in alcuni animali tale effetto tossico non si realizza.

Nell'uomo la presenza percentuale di inclusioni ed il numero di queste, sono nettamente differenti nel corso della malattia sperimentale, allorché paragonate alle cifre ottenute nella malattia naturale.

Prendendo infatti in considerazione casi con analoga intensità di manifestazioni follicolari si è visto come nella malattia naturale la percentuale di persone che presentano inclusioni sia del 10% ed il numero medio di inclusi è 4/30', mentre nel corso della malattia sperimentale tale percentuale è dell'80% ed il numero medio delle inclusioni è 13/30',

Questi valori ci danno una idea della eccezionalità della infezione sperimentale dove, forse in rapporto al numero eccessivo delle particelle virali inoculate, uno straordinario numero di cellule congiuntivali diven-

gono contemporaneamente infette. L'analisi comparativa infine, del reperto morfologico ci fa notare che mentre nella infezione naturale prevalgono inclusioni in fase iniziale di formazione, nella infezione sperimentale queste si presentano in fase avanzata di evoluzione ed assai frequentemente associate alla presenza di cellule giganti. Da quanto sopra si può supporre, indirettamente, che la malattia naturale è mantenuta e si trasmette attraverso il passaggio di quantità di corpuscoli elementari nettamente inferiori a quelle da noi adoperate per trasmettere l'infezione sperimentale.

Un ulteriore fatto, per il quale ci sembra prematuro avanzare un commento, è rappresentato dalla possibilità di ottenere il reisolamento del virus dalle lesioni oculari indotte nell'uomo allorchè paragonata alla possibilità di isolamento della scimmia. Questa ed altre considerazioni (assenza di inclusioni citoplasmatiche nella scimmia) ci fanno presumere la relativamente scarsa sensibilità delle cellule congiuntivali di questo animale per il virus tracomatoso.

La patogenicità del virus per la scimmia varia a seconda del tipo di questa. Nella specie da noi adoperata, la patogenicità nelle condizioni di esperimento previste, è stata pari al 100% in un caso (inoculum 250 DIU<sub>50</sub>) e al 63% in un altro (inoculum 25 DIU<sub>50</sub>). L'animale reagisce con una congiuntivite follicolare tipica: non abbiamo comunque apprezzato a distanza di 120 gg. la comparsa di qualsiasi partecipazione corneale. In un unico caso si è avuto la comparsa dopo 3 mesi, probabilmente al seguito della stimolazione provocata dalla malattia, di una follicolosi palpebrale diffusa di natura aspecifica. In nessun caso è stata notata la presenza di inclusioni citoplasmatiche in strisci ottenute da animali anche con forme gravi di malattia.

Gli esperimenti di patogenicità in altri animali sono appena iniziati e non permettono di avanzare alcuna considerazione, ad eccezione della constatata tossicità per il topo adulto inoculato per via endovenosa.

### 3. Concentrazione e purificazione dei corpuscoli elementari.

A questo riguardo non si sono avute difficoltà particolari. Nella eventualità di una possibile modificazione, apportata dal trattamento eterico alla capacità antigenica del virus, il tempo di contatto con questo è stato ridotto al minimo indispensabile (30"). Il trattamento con Genetron determina una purificazione leggermente superiore a quella operata dall'etere, ma maggiori sono i rischi di contaminazione. Sono in corso esperimenti di vaccinazione in animali per valutare il metodo di purificazione più idoneo a mantenere inalterata la capacità antigene del virus paragonandola a quella di una sospensione di virus vivo.

Durante il nostro lavoro, forzatamente, la concentrazione in corpuscoli elementari delle preparazioni di antigene e di vaccino è stata riferita alla quantità di corpuscoli presenti nel sacco del tuorlo. Anche scegliendo esclusivamente uova con una ricchezza notevole in corpuscoli elementari, non si riesce ad esprimere la potenza di un vaccino allorchè paragonata a quella di un altro proveniente da un altro laboratorio.

Questo fatto impedisce un paragone diretto tra la attività di vaccini di differente provenienza, rendendo difficile una valutazione comparativa dei risultati di vaccinazioni condotte in differenti laboratori. Stimiamo necessario che venga stabilito uno standard di concentrazione in corpuscoli elementari.

#### 4. *Situazione immunitaria nella malattia naturale.*

La seroepidemiologia della infezione tracomatosa è praticamente sconosciuta. Numerosi sono i punti teorici e pratici che ancora debbono essere valutati:

a) Studio delle relazioni antigeniche tra virus tracomatoso ed altri membri del gruppo LGV-Ornitosi;

b) Ricerca di un metodo serologico che permetta il rilevamento degli anticorpi, nella più elevata percentuale possibile di soggetti tracomatosi;

c) Studio del significato neutralizzante degli anticorpi prodotti al seguito della malattia sperimentale ed al seguito della vaccinazione;

d) Studio dell'andamento della situazione immunitaria nel corso della malattia naturale, attraverso le sue successive tappe di evoluzione.

Solo attraverso una adeguata conoscenza dei primi tre punti è possibile impostare una ricerca serologica. I risultati ottenuti devono essere valutati in rapporto all'età, allo stadio della malattia in atto ed al numero probabile delle riaccensioni avute. La percentuale di positività e i titoli anticorpali ottenuti, hanno un significato solo se considerati rispetto alla naturale evoluzione della malattia. Scopo quindi di una indagine seroepidemiologica è quello di comprendere il significato neutralizzante della risposta immunitaria, quando l'evoluzione degli anticorpi si verifica, come essa si mantenga nel decorso cronico della malattia e durante le sue riaccensioni e come infine i valori anticorpali si stabilizzino nei soggetti di età maggiore in cui meno frequenti sono le riprese della malattia.

La nostra esperienza al riguardo si basa solo su dati preliminari. L'impiego della reazione di microagglutinazione, come dimostrato da

altri AA. <sup>(15)</sup> ci ha fornito un ottimo mezzo diagnostico di assoluta specificità e che riteniamo debba essere impiegato come reazione unica in questo campo, una volta stabilita una concentrazione di corpuscoli elementari facilmente standardizzabile. Sulla base di questa reazione, alla quale noi diamo il maggior significato, una media del 75% dei casi di tracoma possono essere diagnosticati.

L'indagine seroepidemiologica sinora condotta con questa reazione, pur considerando il numero dei sieri limitato, ci ha permesso di notare una percentuale di positività crescente in rapporto allo stadio del tracoma presentato dal soggetto. Non si dispone di dati sufficienti per stabilire un rapporto tra titolo degli anticorpi e stadio della malattia.

Sono in corso indagini per stabilire il significato, rapportato alle fasi di evoluzione della malattia, della presenza o assenza percentuale dei due tipi di anticorpi presenti nel corso della malattia e rilevabili l'uno mediante un antigene di gruppo e l'altro attraverso l'antigene virale impiegando la reazione di microagglutinazione.

Ricerche collaterali ci hanno dimostrato la somiglianza fra l'antigene di gruppo del virus tracomatoso e l'antigene solubile estratto dal *B. anitratum* e la somiglianza già nota con l'antigene di gruppo del virus ornitosico, senza che tali affinità possano essere di importanza diagnostica particolare.

Una seconda osservazione si è fatta con l'antigene di gruppo estratto dai corpuscoli elementari tracomatosi: l'attività fissante il complemento di tale antigene è nettamente inferiore a quella ottenibile, con lo stesso metodo, dal virus ornitosico. (Risultati di un singolo esperimento).

### 3. Cutireazione.

Questa reazione, nelle modalità impiegate, ci ha fornito una elevata percentuale di positività che riferita allo stadio di evoluzione della malattia ci ha permesso di rilevare una diminuzione della reattività col progredire delle lesioni attive verso i residui cicatriziali della malattia. Considerando che la presenza percentuale dei sieri positivi per anticorpi, rilevabili con la reazione di microagglutinazione, ha un andamento opposto, si può supporre che il substrato umorale su cui si basa la reattività cutanea è di natura diversa e particolarmente presente nel corso delle manifestazioni attive della malattia.

Un commento particolare meritano le letture dei controlli effettuati a Roma. In questi soggetti infatti è stata notata una reattività pari al 40% basata sulla sola comparsa di una lieve e limitata chiazza eritematosa. Data la difficoltà di apprezzare una tale lieve modificazione in soggetti di pelle scura, si può supporre che una lesione analoga possa essere

stata presente nella stessa percentuale, in tutti i soggetti da noi osservati e che solo rappresenti la percentuale dei soggetti che reagiscono in modo particolare alla sospensione di corpuscoli elementari. E' difficile spiegare, nei casi dell'osservazione di Roma, la comparsa della reazione completa (eritema e papula).

#### 6. *Prove di vaccinazione.*

##### *Prevenzione.*

L'insieme dei dati raccolti, sia nell'uomo che nella scimmia, ci ha permesso di mettere in evidenza una indubbia attività da parte dei vaccini impiegati. La mancanza, per il momento, dei dati serologici relativi, non ci permette una interpretazione sicura di quanto abbiamo avuto modo di osservare.

##### *Esperimento di vaccinoterapia.*

I risultati riferiti, relativi all'osservazione eseguita a distanza di due mesi dalla vaccinazione, non ci autorizzano ad emettere alcuna considerazione definitiva, è stato infatti dimostrato che, malgrado i buoni risultati iniziali, un esperimento di vaccinoterapia può evolvere in modo del tutto differente ad una distanza di tempo maggiore dalla vaccinazione <sup>(16)</sup>, per cui ci ripromettiamo di ritornare su questo punto successivamente <sup>(17)</sup>.

Gli AA. esprimono il loro vivo ringraziamento a Sua Maestà l'Imperatore di Etiopia Hailé Sellassié per aver patrocinato e favorito il piano di ricerche; al Governo Eritreo, per l'aiuto ed il permesso accordato per il programma di vaccinazione; al Dott. C. Call, direttore dell'Istituto vaccinogeno di Asmara, per averci permesso di eseguire presso il suo Istituto tutte le prove condotte in animali e per la sua consulenza specialistica; al prof. P. Sforza, direttore dell'Ufficio Provinciale di Igiene e Profilassi di Asmara, per l'aiuto nel controllo batteriologico delle ricerche, per i consigli sullo svolgimento del lavoro nonchè per la concessione di apparecchi scientifici; al dott. E. S. Murray, delle Università di Harvard, Boston, USA, per averci assistito nel primo mese della ricerca e per l'invio di materiale dal laboratorio di Dharhan (Arabia Saudita).

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

Roma — Clinica Oculistica dell'Università.

Asmara — Centro Oftalmico Hailé Selassié 1°.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ARAKAWA S. e KITAMURA O. - Jap. J. exp. Med., 20: 579 (1930).
  - (2) T'ANG F. F., CHANG H. L., HUANG Y. T. e WANG K. C. - Chin. med. J., 75: 429
  - (3) BALDUCCI D., FELICI A., CASTELLI L., GORI G. B., MANCINI G., PAULUZZI S., VOZZA R. e PENSO G. - Rend. Ist. sup. Sanità, XXIII 303 (1960).
  - (4) PAULUZZI S. e FELICI A. - Rend. Ist. sup. Sanità, in corso di stampa.
  - (5) VOZZA R. e BALDUCCI D. - Am. J. Ophthal., in corso di stampa.
  - (6) FELICI A., BALDUCCI D., CASTELLI L., MANCINI G., PAULUZZI S., AUREGGI A., KIRAY G., MILAZZO M., SANTORO R., STOFOROS E., VERANI P. e PENSO G. - Rend. Ist. sup. Sanità, in corso di stampa.
  - (7) BOVARNICK M. R., MILLER J. C. e SNYDER J. C. - J. Bact., 59: 309 (1930).
  - (8) NIGG C., HILLEMANN M. R. e BOWSER B. M. - J. Immunol., 53: 259 (1946).
  - (9) MURRAY E. S., SNYDER J. C. e BELL S. D. - Sesto Congresso Internazionale di Medicina Tropicale. Lisbona-Portogallo.
  - (10) VOLKERT M. e MATHIESEN H. - Acta path. microbiol. scand., 39: 117 (1956).
  - (11) FULTON F. e DUMBELL K. R. - J. gen. Microbiol., 3: 97 (1949).
  - (12) DULBECCO R. e VOGI M. - J. exp. Med., 90: 167 (1954).
  - (13) BABUDIERI B. - Advances in the control of Zoonosis - WHO monograph, Geneva, 193 (1953).
  - (14) BELL S. D., SNYDER J. C. e MURRAY E. S. - Science, in corso di stampa.
  - (15) BABUDIERI B. - Comunicazione Accademia Medica di Roma, 23 maggio 1960.
  - (16) MURRAY E. S. - Comunicazione personale.
  - (17) FELICI A. - Comunicazione Società Oftalmologica Romana, 8 dicembre 1960.
-