

Ricerche sugli inibitori verso i virus influenzali

DAN SARATEANU (*) e ADELE MARIA JEMOLO

Laboratori di Microbiologia

Riassunto. — Per distruggere gli inibitori aspecifici dell'emoagglutinazione dei virus influenzali, sieri di conigli e di cavie sono stati trattati con vari metodi: calore, KIO_3 , KIO_4 e tripsina, RDE.

Il trattamento dei sieri con KIO_3 o con KIO_4 e tripsina induce degli inibitori verso il virus influenzale di tipo B o aumenta il titolo degli inibitori preesistenti.

La concentrazione di KIO_4 usata per il trattamento dei sieri è sufficiente, di per sè stessa, ad inattivare diversi tipi di virus influenzali (FM1; B/Roma/67; A2/Hong Kong).

I sieri trattati possono ancora venire usati dopo 2 settimane di conservazione a $-30^\circ C$.

Non è possibile raccomandare un metodo di uso generale per l'eliminazione degli inibitori aspecifici.

Summary (*Research on influenza virus inhibitors*). — To destroy non specific inhibitors of influenza virus hemagglutination, rabbit and guinea pig sera have been treated in different ways: heat, KIO_3 , KIO_4 and trypsin, RDE.

Treatment of sera with KIO_3 or KIO_4 and trypsin induces inhibitors against type B influenza virus, or increases the titer of the preexistent ones.

The concentration of the KIO_4 used for the sera treatment is sufficient by itself to inactivate different types of influenza viruses (FM1; B/Roma/67; A2/Hong Kong).

Sera treated in the above way, can still be used after 2 weeks of storage at $-30^\circ C$.

It is not possible to recommend a general method for the elimination of the non specific inhibitors.

(*) Borsista dei Laboratori di Microbiologia. Capo reparto sezione malattie umane virali - Istituto di Inframicrobiologia, S. Nicolau - Bucarest.

Molte ricerche sono state dedicate allo studio degli inibitori della emoagglutinazione da parte dei virus influenzali, inibitori presenti nei sieri di varie specie animali e nei sieri umani (FRANCIS, 1947; CHU, 1951; SMITH, WESTWOOD & BELYAVIN, 1951; COHEN & BELYAVIN, 1959; 1961; COHEN, NEWLAND & BIDDLE, 1963; COHEN, BIDDLE & NEWLAND, 1965; COHEN & DORMAN, 1965). Sono stati dettagliatamente studiati anche i vari metodi per eliminare tali inibitori. Rimandiamo, a tale proposito, all'ampia bibliografia di ANANTHANARAYAN & JAYARAN PANIBER (1960).

Il rapporto del Comitato di Esperti delle Malattie Virali delle Vie Respiratorie (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 1959) consigliava tre metodi principali che sono ancora largamente in uso:

- 1°) Il trattamento con CO_2 ;
- 2°) Il trattamento con periodato $(\text{KIO})_4$;
- 3°) Il trattamento con *Receptor Destroying Enzyme* (RDE).

Recentemente alcuni AA. (MASCOLI, LEOGUS & HILLEMANN, 1965; BEARDMORE *et al.*, 1968) hanno osservato la comparsa *ex novo* o l'aumento del titolo degli inibitori contro vari ceppi di virus influenzale del tipo B, in sieri di diverse specie animali ed in sieri umani, in seguito al trattamento con KIO_4 .

Sia questi dati, sia l'osservazione che non sempre i trattamenti adoperati per la rimozione degli inibitori danno risultati costanti e facilmente interpretabili, ci hanno spinto ad ulteriori ricerche su questi ed altri aspetti controversi, quali, ad esempio, la possibilità di utilizzare, a distanza di tempo, sieri trattati con i vari procedimenti per la distruzione degli inibitori e conservati a -30°C .

MATERIALI E METODI

Virus.

I ceppi utilizzati sono stati: un ceppo di virus B/Roma/67 isolato e passato ripetutamente in uovo; un ceppo di virus B/Roma/67 isolato e passato *in vitro* su colture cellulari di rene di scimmia Rhesus (*M. mulatta*); un ceppo di virus A 2/Roma/68 isolato e coltivato in uovo, e lo stesso ceppo A 2/Roma/68 dopo venti passaggi in colture cellulari di rene di Rhesus. Sono stati inoltre utilizzati ceppi standard quali FM 1, A 2 Hong Kong e NWS, tutti coltivati in uovo.

Sieri.

I sieri di coniglio e cavia normali sono stati ottenuti salassando animali adulti dal cuore. I sieri con attività specifica furono ottenuti, dal coniglio, inoculando una sola volta, per via endovenosa, 10 ml di liquido allantoideo o di liquido colturale infetti con i vari ceppi virali.

Per le cavie vennero utilizzati gli stessi antigeni, ma l'inoculazione fu di 5 ml per via intraperitoneale. Il salasso venne eseguito dopo 15 gg. dall'inoculazione del virus.

Trattamento dei sieri.

Per l'eliminazione degli inibitori vennero usate forme diverse di trattamento:

- 1°) trattamento con RDE (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 1959);
- 2°) trattamento con KIO_4 (ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 1959);
- 3°) trattamento con KIO_4 e tripsina (LENETTE & SCHMIDT, 1964);
- 4°) trattamento con calore (30 min a 56° C).

I sieri trattati vennero conservati, durante le ricerche, a -30°C .

Emoagglutinazione (EA) ed emoagglutinoinibizione (EAI).

L'EA e l'EAI vennero eseguite con il micrometodo di TAKATSY (1965) usando una sospensione standard 0,5 % di emazie di pollo. In ogni prova di EAI vennero usate 8 unità virali.

Soluzione Tampone.

Come diluente in tutte le reazioni di EA e di EAI, venne usato l'FTA Hemagglutination Buffer del Baltimore Biological Laboratory.

Frazionamento dei sieri.

Il frazionamento dei sieri venne eseguito su colonna Sephadex 6.200, secondo la tecnica di PHILIPSON, KILLANDER & ALBERTSON (1966). La colonna era alta 50 cm. con diametro di 3 cm. L'eluizione venne eseguita con Tris 0,1 M a pH 8 e la velocità del flusso di 16 ml per ora.

Sieroneutralizzazione.

Per le prove di neutralizzazione venne eseguita la tecnica classica che utilizza una dose fissa di virus (100 DIU/50) e dosi scalari di siero.

RISULTATI

Inibitori verso il virus B/Roma/67 in sieri normali di coniglio non trattati e trattati con KIO_4 .

I risultati concernenti i sieri di coniglio normali, non trattati e trattati con KIO_4 , sono sintetizzati nella Tab. 1 e nelle Fig. 1 e 2.

Dalla Tab. 1 risulta che, prima del trattamento con KIO_4 , su 21 sieri esaminati, 13 avevano un effetto inibitore verso il virus coltivato in uovo, con un titolo variante da 1 : 10 a 1 : 80, ed una media ponderata di 1 : 21,4. Dopo il trattamento, 19 sieri su 21 presentavano un effetto inibitore verso lo stesso virus, con titoli varianti da 1 : 10 a 1 : 160, ed una media ponderata di 1 : 66,3.

TABELLA 1.

Inibitori verso il virus B/Roma/67 in sieri normali di coniglio non trattati e trattati con KIO_4

Virus	Sieri	N° Sieri	Sieri		Titolo inibitori						Media ponderata
			-	±	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
B Roma	SCN	21	8	13	3	3	5	2	—	—	1/24,4
Uovo	SCNP	21	2	19	2	6	2	5	4	—	1/66,3
B Roma	SCN	15	9	6	2	3	1	—	—	—	1/20
Rhesus	SCNP	15	1	14	2	3	4	3	1	1	1/68,5

SCN = sieri di coniglio normali.

SCNP = sieri di coniglio normali trattati con KIO_4 .

Per quanto riguarda l'azione inibitrice dei sieri verso il virus coltivato *in vitro*, su 15 sieri esaminati 6 possedevano questa azione, con titolo variante da 1 : 10 a 1 : 40, ed una media ponderata di 1 : 20. Dopo il trattamento

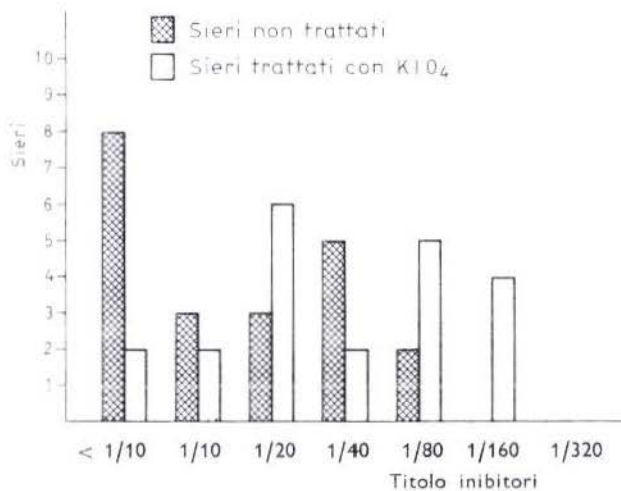


Fig. 1. — Inibitori dei sieri di conigli normali verso il virus B Roma 67 coltivato in uovo.

con KIO_4 , 14 sieri su 15 presentavano azione inibitrice, con titolo variante da 1 : 10 a 1 : 320, e la media ponderata era di 1 : 68,5.

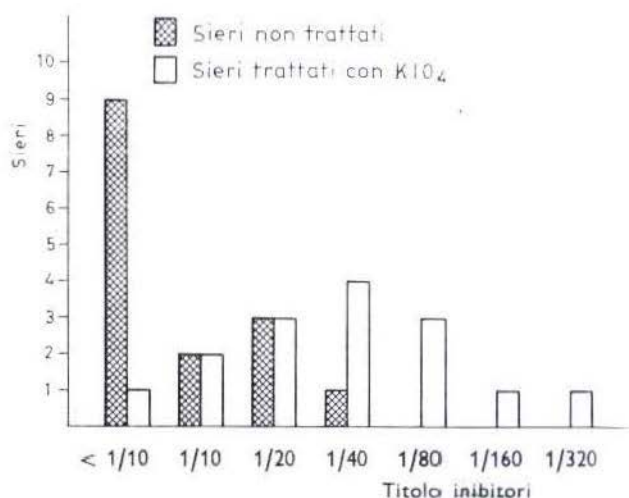


Fig. 2. — Inibitori dei sieri di conigli normali verso il virus B/Roma/67 coltivato *in vitro*.

Inibitori verso il virus B/Roma/67 nei sieri normali di cavia non trattati e trattati con KIO_4 .

I risultati che si riferiscono ai sieri normali di cavia sono raccolti nella Tab. 2.

Dei 10 sieri esaminati, prima del trattamento con KIO_4 , due soli avevano azione inibitrice verso il virus sia coltivato in ovo sia coltivato *in vitro*. Dopo il trattamento con KIO_4 , in tutti e 10 i sieri comparvero inibitori

TABELLA 2.

Inibitori verso il virus B/Roma/67 in sieri normali di cavia non trattati e trattati con KIO_4 .

Virus	Sieri	N° Sieri	Sieri		Titoli inibitori					Media ponderata
					1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	
B Roma Uovo	SCaN	10	8	2	—	1	—	—	1	90
	SCaNP	10	7	3	—	1	—	—	2	113,3
B Roma Rhesus	SCaN	10	8	2	—	1	1	—	—	30
	SCaNP	10	—	10	2	5	—	—	3	60

SCaN = sieri di cavia normali.

SCaNP = sieri di cavia normali trattati con KIO_4 .

verso il virus coltivato *in vitro*, con titoli varianti da 1 : 10 a 1 : 160, ed una media ponderata di 1 : 60. In 3 dei 10 sieri il trattamento con KIO₄ indusse la comparsa di inibitori verso il virus coltivato in uovo.

Conservazione degli inibitori a -30°C.

I dati sulla conservazione degli inibitori nei sieri trattati e non trattati conservati a -30° C per due settimane, sono raccolti nella Tab. 3. Si può osservare che gli inibitori inizialmente presenti nei sieri non trattati e trattati con KIO₄, dopo due settimane a -30°C, sono conservati o aumentati

TABELLA 3.

Conservazione a -30°C degli inibitori verso il virus B/Roma/67 in sieri normali di coniglio non trattati e trattati con KIO₄

Virus	Sieri	N° Sieri	Sieri - +	Titoli inibitori					Media ponderata
				1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	
B Roma uovo	SCN	8	5 3	3	—	—	—	—	1/10
	SCN 2 settimane -30°C	8	4 4	2	2	—	—	—	1/15
	SCNP	8	2 6	2	4	—	—	—	1/16
	SCNP 2 settimane -30°C	8	3 5	3	1	1	—	—	1/20
B Roma Rhesus	SCN	8	4 4	2	1	1	—	—	1/20
	SCN 2 settimane -30°C	8	5 3	—	3	—	—	—	1/20
	SCNP	8	2 6	—	1	4	1	—	1/45
	SCNP 2 settimane -30°C	8	1 7	2	1	1	1	2	1/68,5

SCN = sieri di coniglio normali.

SCNP = sieri di coniglio normali trattati con KIO₄.

di titolo. L'aumento è più evidente per quel che riguarda gli inibitori, indotti dal KIO₄ verso il virus B/Roma/67 coltivato *in vitro*. La media ponderata di tali inibitori, che era di 1 : 45 nella prova iniziale, raggiunse il valore di 1 : 68,5 nella prova eseguita dopo due settimane, mentre verso il virus coltivato in uovo variò da 1 : 16 a 1 : 20.

Gli inibitori indotti nei sieri di cavia, dal trattamento con KIO_4 , non si conservarono, invece, dopo due settimane a $-30^\circ C$.

Dopo un mese di conservazione a $-30^\circ C$, anche gli inibitori dei sieri di coniglio erano scomparsi o fortemente diminuiti.

Inibitori verso il virus B/Roma/67 in sieri di coniglio e di cavia trattati con KIO_4 e tripsina.

Nelle prove eseguite con il virus coltivato in uovo e *in vitro*, il trattamento dei sieri con KIO_4 e tripsina dette risultati assai simili a quelli ottenuti con il solo trattamento con KIO_4 . Nei sieri normali, l'incidenza degli inibitori e la media ponderata dei loro titoli aumentarono, dopo il trattamento con KIO_4 e tripsina, verso il virus coltivato in uovo, e verso quello coltivato *in vitro*, ma più sensibilmente verso questo ultimo. Dopo due settimane di conservazione a $-30^\circ C$, i titoli apparvero aumentati.

Inibitori verso il virus B/Roma/67 nei sieri di coniglio trattati con RDE.

Su 16 sieri di coniglio esaminati, 7 presentavano inibitori verso il virus coltivato in uovo e *in vitro*. Il trattamento con RDE distrusse completamente l'inibitore verso il virus coltivato *in vitro*, mentre l'inibitore verso il virus coltivato in uovo venne distrutto solamente in 4 sieri (Tab. 4).

TABELLA 4.

Inibitori verso il virus B/Roma/67 in sieri normali di coniglio non trattati e trattati con RDE

Virus	Sieri	N° sieri	Sieri		Titolo inibitori			
			-	+	1/10	1/20	1/40	1/80
B Roma . . .	SCN	16	9	7	3	3	—	1
Uova	SCN+RDE	16	13	3	1	1	1	—
B Roma . . .	SCN	16	9	7	1	5	1	—
Rhesus . . .	SCN+RDE	16	16	0	—	—	—	—

SCN = sieri di coniglio normali.

SCN+RDE = sieri di coniglio normali trattati con KIO_4 .

Nei sieri di cavia il trattamento con RDE distrusse totalmente gli inibitori verso il virus coltivato in uovo e in 9 su 10 sieri anche gli inibitori verso il virus coltivato *in vitro*.

Inibitori verso il virus A2/Roma/68, in sieri di coniglio e cavia normali non trattati e dopo i vari trattamenti.

I dati riguardanti gli inibitori verso il virus influenzale A2/Roma/68 presenti nei sieri di conigli normali, sono raccolti nella Tab. 5. Su 16 sieri non trattati, 12 avevano inibitori verso il virus coltivato in uovo. Il tratta-

TABELLA 5.

Inibitori verso il virus A2/Roma/68 in sieri normali di coniglio non trattati e trattati con KIO_4

S i e r i	N° sieri	A2 Roma uova		A2 Roma Rhesus	
		Sieri		Sieri	
		-	+	-	+
SCN	16	4	12	2	14
SCN 2 settimana -30°C	11	9	2	3	8
SCNP	16	13	3	14	2
SCNP 2 settimana -30°C	11	11	0	11	0

SCN = sieri di coniglio normali.

SCNP = sieri di coniglio normali trattati con KIO_4 .

mento con KIO_4 distrusse questi inibitori nella maggior parte dei sieri e la conservazione a $-30^\circ C$ per due settimane ebbe effetto analogo. Gli inibitori verso il virus coltivato *in vitro* erano presenti in 14 sieri su 16, ed a titolo più alto. Il trattamento con KIO_4 distrusse questi inibitori nella maggior parte dei sieri, mentre essi si mostrarono più resistenti alla conservazione a $-30^\circ C$. Il trattamento con KIO_4 e tripsina dette risultati analoghi a quelli osservati dopo il trattamento con solo KIO_4 .

I 10 sieri di cavia non possedevano inibitori verso il virus coltivato in uovo, mentre 6 presentavano inibitori verso quello coltivato *in vitro*, inibitori distrutti completamente dal trattamento con KIO_4 o con KIO_4 e tripsina. La conservazione a $-30^\circ C$ per due settimane li distrusse in uno solo dei 6 sieri.

Dopo trattamento con RDE, gli inibitori verso il virus A2/Roma/68 coltivato in uovo, erano ancora presenti in 8 dei 12 sieri di coniglio che li avevano all'inizio. Gli inibitori verso il virus coltivato *in vitro* erano ancora presenti in 5 dei 14 sieri inibenti. Dei 6 sieri di cavia che avevano mostrato

azione inibitrice verso il virus coltivati *in vitro*, uno solo mantenne tale azione dopo il trattamento con RDE.

Il frazionamento di uno dei sieri di coniglio su colonna Sephadex G. 200, mise in evidenza tre picchi per le proteine. La frazione del siero responsabile dell'azione inibitrice venne riscontrata nel picco delle macroglobuline (Fig. 3).

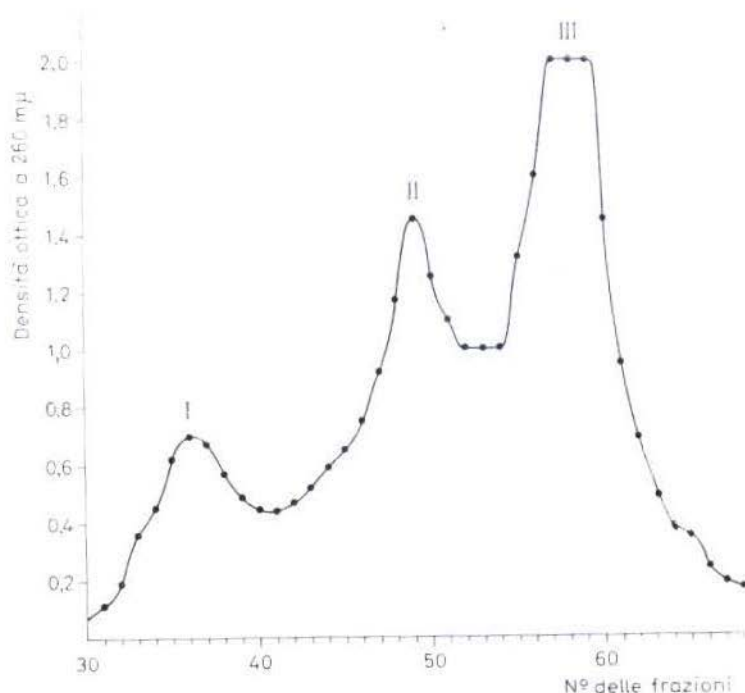


Fig. 3. — Frazionamento di un siero di coniglio su colonna Sephadex G. 200.

I. — picco delle macroglobuline. II. — picco delle globuline. III. — picco delle albumine.

L'eventuale attività neutralizzante dei sieri con inibitori indotti da KIO₄ non fu stabilita, poichè la concentrazione di KIO₄ usata nel trattamento dei sieri era, di per se stessa, sufficiente ad inattivare completamente i virus adoperati (B/Roma/67, FM1, A2/Roma/68, A2/Hong Kong).

Azione dei vari trattamenti sugli anticorpi specifici.

Prima dell'immunizzazione con virus A2/Roma/68 coltivato in ovo, i sieri dei due conigli adoperati a tale scopo avevano un titolo EAI inferiore ad 1 : 10 sia verso il virus A2/Roma/68 coltivato in ovo, sia verso lo stesso virus coltivato *in vitro*. Dopo l'immunizzazione il titolo EAI divenne di 1 : 80 verso entrambi i virus.

I trattamenti con KIO_4 e con KIO_3 e tripsina abbassarono il tasso degli anticorpi verso il virus usato per l'immunizzazione, senza peraltro distruggerli completamente (da 1 : 80 a 1 : 20, e da 1 : 80 a 1 : 40), mentre il riscaldamento a 56° C per 30 min ed il trattamento con RDE, non lo modificarono. Gli anticorpi emoagglutinoinibenti riscontrati in questi due sieri verso il virus A2/Roma/68 coltivato *in vitro*, furono, invece, completamente distrutti dal trattamento con KIO_4 e con KIO_3 e tripsina. Anche il trattamento con RDE ed il riscaldamento a 56°C per 30 min ne abbassarono il titolo.

I sieri dei quattro conigli immunizzati con il virus A2/Roma/68 coltivato *in vitro*, presentavano, prima dell'immunizzazione, inibitori a basso titolo (da 1 : 10 a 1 : 20) sia verso il virus coltivato in uovo, sia verso il virus coltivato *in vitro*. Tali inibitori scomparivano completamente dopo il trattamento con RDE. Dopo l'immunizzazione il titolo EAI aumentò da due a quattro volte in tutti i sieri.

I risultati ottenuti dopo i vari trattamenti furono comparabili ai precedenti, nel senso che gli anticorpi verso il virus usato per l'immunizzazione non furono influenzati dal trattamento con RDE e con il calore, e furono solamente abbassati dal trattamento con KIO_4 e con KIO_3 e tripsina, mentre gli anticorpi verso il virus coltivato in uovo vennero distrutti da tutti i trattamenti.

Nelle prove eseguite dopo due settimane, il titolo degli anticorpi, nei sieri conservati a — 30° C, apparve immutato o solo lievemente diminuito.

DISCUSSIONE

L'induzione di inibitori aspecifici dell'emoagglutinazione da virus influenzali, in seguito a vari trattamenti dei sieri, non è un fatto nuovo. Già prima di risultati di MASCOLI, LEOGUS & HILLEMANN (1965) e di BEARDMORE *et al.* (1968) sull'induzione di inibitori dell'emoagglutinazione da virus influenzale di tipo B dopo trattamento con KIO_4 , era stata segnalata l'induzione di inibitori contro un virus di tipo A, dopo trattamento con KIO_4 delle sostanze mucoidi presenti nel siero (BURNET, 1948 ; 1949), e di inibitori verso un virus di tipo C, mediante trattamento dei sieri con filtrato di vibrione colerico (HILLEMANN & WERNER, 1953).

Le nostre ricerche hanno confermato l'induzione di inibitori o l'aumento di titolo degli inibitori già presenti verso il virus influenzale di tipo B, nei sieri trattati con KIO_4 . Abbiamo inoltre constatato un effetto del tutto analogo, dopo trattamento con KIO_4 e tripsina, trattamento che, da alcuni AA. (ANANTHA, NARAYAN & JAYARAM PANIBER, 1960), veniva considerato come il più idoneo alla rimozione degli inibitori stessi. KIO_4 e KIO_3 e tripsina non ebbero lo stesso effetto sui sieri di coniglio e di cavia ; anche BURNET

(1951) aveva osservato una diversità di effetto prodotto dal KIO_4 nei sieri di diverse specie animali.

È da notare che i titoli degli inibitori da noi riscontrati, sia verso il virus A2, sia verso il virus B, furono costantemente di molto inferiori a quelli riportati da altri AA. Ciò non ci stupisce essendo noto che la microtecnica di TAKATSY (1965) dà titoli EA ed EAI notevolmente più bassi di quelli che si ottengono con altre tecniche. I sieri di coniglio e di cavia che avevano, secondo la tecnica da noi usata, un titolo EAI inferiore a 1 : 10, avrebbero forse potuto mostrare chiaramente la presenza degli inibitori con tecniche diverse. Per ciò che riguarda l'induzione di inibitori verso il virus B, in seguito al trattamento con KIO_4 , non è da escludere che le diversità osservate fra i nostri risultati ed i risultati di altri AA. (MASCOLI, LEOGUS & HILLEMANN, 1965; BEARDMORE *et al.*, 1968) possano anche esser dovute all'uso di un diverso tipo di emazie (emazie di pollo nelle nostre ricerche, ed emazie umane di gruppo O nelle ricerche citate), o anche ad una diversità nel trattamento con KIO_4 (Gli Autori citati usavano 1 volume di siero contro 6 volumi di KIO_4 , mentre, nella tecnica da noi seguita, il rapporto tra siero e KIO_4 era di 1 a 3).

L'induzione di inibitori verso il virus influenzale di tipo B, dopo trattamento con KIO_4 e KIO_4 e tripsina, è un dato da tenere presente nelle indagini sierologiche sull'influenza, perchè potrebbe essere motivo di errori diagnostici.

Come già altri AA., anche noi riteniamo che non vi sia la possibilità di indicare un metodo unico di trattamento dei sieri, sempre valido per la rimozione degli inibitori. Infatti gli inibitori presenti nei sieri variano qualitativamente e quantitativamente da specie a specie e da individuo a individuo nell'ambito della stessa specie, (COHEN, NEWLAND & BIDDLE, 1963), e varia di conseguenza l'effetto dei diversi trattamenti (BURNET, 1961). Anche la sensibilità dei ceppi virali agli inibitori è estremamente diversa (la comparsa dei ceppi A2 rivelò, ad esempio, l'esistenza dell'inibitore γ , non inattivabile con RDE, al quale questi soli ceppi sono sensibili). Inoltre la coltivazione di un virus su ospiti differenti può indurre un mutamento nella sua sensibilità agli inibitori (COHEN & BIDDLE, 1960), probabilmente perchè la maggioranza dei ceppi deve considerarsi composta da una popolazione eterogenea. I ripetuti passaggi su di un ospite diverso dall'uovo, come anche passaggi in uovo in presenza di un inibitore o a diluizioni terminali (CHOPPIN & TAMM, 1961) possono portare alla selezione di una popolazione omogenea con caratteristiche particolari.

Di assai difficile interpretazione ci sembrano i nostri dati riguardanti gli anticorpi. Non ci stupisce il fatto che il titolo EAI dei sieri immuni abbia subito delle variazioni in seguito ai trattamenti per la rimozione degli inibitori. Infatti le ricerche di STYK (1965) e di STYK & HANA (1961; 1965)

sul cofattore hanno ampiamente dimostrato la sensibilità degli anticorpi (specie se anticorpi precoci) a tali trattamenti. Parrebbe però che i vari trattamenti agiscano più fortemente sugli anticorpi quando il siero dell'animale immunizzato venga fatto reagire con un ceppo che differisca da quello usato per l'immunizzazione *solamente* per essere stato coltivato in un ospite diverso. Gli anticorpi non vengono invece sostanzialmente influenzati dai vari trattamenti, quando il ceppo virale usato per l'immunizzazione e quello adoperato per le prove di EAI sono identici; così, ad esempio, il siero dei conigli immunizzati con virus A2/Roma/68 coltivato in uovo, dopo i vari trattamenti, conservava una parte degli anticorpi verso il virus coltivato in uovo, mentre scomparivano quelli verso il virus coltivato *in vitro*).

È forse possibile che, nel processo di immunizzazione, agiscano due fattori antigenici: un fattore virale vero e proprio ed un fattore legato alla cellula ospite. Gli anticorpi indotti dal fattore virale potrebbero essere più sensibili all'azione dei vari trattamenti. Riguardo alla possibilità di utilizzare sieri trattati a distanza di tempo, conservandoli a -30°C , ci sembra che, limitatamente ad un breve periodo, tale possibilità non possa venir esclusa.

CONCLUSIONI

1) Il trattamento con KIO_4 di sieri di coniglio o di cavia, può indurre inibitori verso il virus influenzale di tipo B, o aumentare il titolo degli inibitori già presenti.

2) La concentrazione di KIO_4 utilizzata per il trattamento dei sieri è di per sé stessa sufficiente ad inattivare vari ceppi influenzali (FMI,B/Roma/67, A2 Hong Kong).

3) I sieri trattati con vari metodi possono venir utilizzati anche dopo 2 settimane di conservazione a -30°C .

4) Non si può raccomandare un trattamento universalmente valido per l'eliminazione degli inibitori.

Ringraziamo vivamente la Dott.ssa Liliana Kawaklova, dell'Istituto di microbiologia di Sofia, borsista presso l'Istituto Superiore di Sanità, che ha eseguito le prove di frazionamento dei sieri.

4 marzo 1969.

BIBLIOGRAFIA

- ANANTHANARAYAN, R. & Ck. JAYARAM PANIBER, 1960. *Bull. Organ. Mondiale Santé*, **22**, 409.
BEARDMORE, W. B., Kv. JONES, T. D. CLARK & E. K. HEBEKA, 1968. *Appl. Microbiol.*, **16**, 563.
BURNET, F. M., 1948. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **26**, 381.
BURNET, F. M., 1949. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **27**, 361.

- BURNET, F. M., 1951. *Physiol. Rev.*, **31**, 131.
- CHOPPIN, P. W. & I. TAMM, 1961. *J. Exptl. Med.*, **112**, 895.
- CHU, C. M., 1951. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 739.
- COHEN, A. & G. BELYAVIN, 1959. *Virology*, **7**, 1.
- COHEN, A. & G. BELYAVIN, 1961. *Virology*, **13**, 58.
- COHEN, A. & F. BIDDLE, 1960. *Virology*, **11**, 458.
- COHEN, A., F. BIDDLE & S. E. NEWLAND, 1965. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **46**, 5.
- COHEN, A. & J. DORMAN, 1965. *Acta Virol.*, **9**, 6.
- COHEN, A., S. E. NEWLAND & F. BIDDLE, 1963. *Virology*, **20**, 518.
- FRANCIS, T. H., 1947. *J. Exptl. Med.*, **85**, 1.
- HILLEMANN, M. R. & J. H. WERNER, 1953. *J. Immunol.*, **71**, 100.
- LENNETTE, E. H. & V. J. SCHMIDT, 1964. *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases*, Am. Public Health Assoc. Inc. New York, 38.
- MASCOLI, C. C., M. B. LEOGUS & M. R. HILLEMANN, 1965. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **123**, 952.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 1959. *Série Rappt. Tech.*, N. 170, 41.
- PHILIPSON, A., I. KILLANDER & A. ALBERTSON, 1966. *Virology*, **28**, 22.
- SMITH, W., J. C. N. WESTWOOD & G. BELYAVIN, 1951. *Lancet*, **2**, 1189.
- STYK, B., 1965. *Acta Virol.*, **9**, 210.
- STYK, B. & L. HANA, 1961. *Acta Virol.*, **5**, 194.
- STYK, B. & L. HANA, 1965. *Acta Virol.*, **9**, 200.
- TAKATSY, G., 1965. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 191.