

Studio di alcune caratteristiche biologiche di ceppi di virus influenzale A2/68

ADELE MARIA JEMOLO e DAN SARATEANU (*).

Laboratori di Microbiologia

Riassunto. — Lo studio di alcune caratteristiche biologiche dei ceppi A2/Hong Kong, A2/Aichi, A2/England/68 non ha dimostrato alcuna sensibile diversità fra i ceppi stessi.

È da segnalare che, durante le prove eseguite per saggiare la termoresistenza dell'emoagglutinina, il titolo EA presentò un andamento particolare, con diminuzioni e successivi aumenti, dovuti forse a fenomeni di disgregazione e riassociazione delle unità proteiche sede del potere emoagglutinante.

È stata confermata l'utilità dei marker usati nella differenziazione dei vari ceppi di virus influenzali.

Summary (*Study of some biological characteristics of strains of A2/68 influenza virus*). — The study of the biological characteristics of strains A2/Hong Kong, A2/Aichi and A2/England/68 did not reveal any great difference between these strains.

It is worth noting that, during the tests of the hemagglutinin thermo-resistance, the HA titre tended to vary, rising and then falling again, possibly due to the phenomenon of dissociation and reassociation of the protein hemagglutinating units.

The methods used have confirmed their utility for the differentiation between various strains of influenza virus.

È noto che alcuni ceppi di virus influenzali, che appaiono antigenicamente identici nelle diverse prove sierologiche, possono differire tra loro per varie caratteristiche genetiche (LEVY & WAGNER, 1958; CHOPPIN,

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

OSTERHOUT & TAMM, 1958; SOKOLOV & OBROSOVA SEROVA, 1963; CHOPPIN & TAMM, 1964; SIMPSON & HAUSER, 1966; TUCKOVA, VONKA & STAREK, 1968; RATHOVA *et al.*, 1968). In realtà quasi tutti i ceppi di virus sono composti da una popolazione eterogenea, e la prevalenza di particelle dotate di speciali proprietà, può dare al ceppo alcune particolarità biologiche diverse. La cellula ospite nella quale sia stato fatto l'isolamento del virus e che sia stata usata per i successivi passaggi, è indubbiamente un fattore importantissimo nel determinare tale prevalenza (BURNET & LIND, 1954; DRAKE & LAY, 1962; STENBACK & DURAND, 1963; VONKA, TUCKOVA & BRAUEROVA, 1968).

Date queste premesse abbiamo preso in esame i nuovi ceppi di virus influenzale A2, comparsi durante l'epidemia del 1968-1969, allo scopo di controllare se fra di essi esistessero diversità di qualche rilievo relative alle loro caratteristiche immuno-biologiche.

MATERIALI E METODI

Virus.

I ceppi virali usati furono:

1) A2/Hong Kong, ricevuto dal Dr. H. Pereira del WHO Influenza Center: isolamento e un primo passaggio in cellule renali di Rhesus, 5 passaggi successivi nella cavità allantoidea di embrione di pollo.

2) A2/Aichi, ricevuto come il precedente: isolamenti in amnios, 7 passaggi nella cavità allantoidea di embrione di pollo.

3) A2/England/68, ricevuto dal Dr. F. Perkins, isolamento in amnios, 3 passaggi nella cavità allantoidea di embrione di pollo.

Questi ceppi vennero coltivati nella cavità allantoidea di uova embrionate in 10^a giornata. I liquidi infetti vennero raccolti dopo 48h d'incubazione a 33°C e riuniti in un pool, sterile dal punto di vista batteriologico, e mantenuti a -30° sino al momento dell'uso.

A scopo di controllo vennero utilizzati i ceppi: A2/Taiwan, A2/England/64, A2/Singapore, A2/Roma/65, A2/Roma/68, B/Roma/67 e B/Johannesburg, tutti coltivati nella cavità allantoidea.

Soluzione tampone.

Come diluente in tutte le reazioni sierologiche venne adoperato l'FTA Hemagglutination Buffer del Baltimore Biological Laboratory.

Emazie.

Emazie di uomo, pollo, montone, scimmia (*M. mulatta*), cavallo, vacca, vitello, topo e cavia vennero raccolte in soluzione di Alsever, lavate tre volte

con la soluzione tampone, e poi risospese nella stessa soluzione alla concentrazione del 0,5 %.

Sieri normali.

Vennero usati sieri di coniglio e cavallo adulti e sani. I sieri vennero conservati a -30°C .

Sieri immuni.

I sieri immuni provenivano da gruppi di topi (10-12 per ogni gruppo) del peso di 20 g, inoculati per via intraperitoneale con ml 0,5 di liquido allantoideo non diluito e diluito 1/5, 1/25, e 1/125. Prima dell'inoculazione i liquidi allantoidei dei tre ceppi erano stati diluiti in modo che contenessero lo stesso numero di unità emoagglutinanti. Dopo 15 giorni dall'inoculazione gli animali vennero salassati ed i sieri di ogni gruppo riuniti fra di loro.

Inibitore da uovo.

L'inibitore da uovo venne preparato secondo la tecnica di TUCKOVA, VONKA & STAREK (1968).

Purificazione dei virus.

I tre ceppi virali in esame vennero purificati mediante due cicli di adsorbimento ed eluzione con emazie di pollo.

Emoagglutinazione (EA) ed Emoagglutinoinibizione (EAI).

Tutte le prove di EA e di EAI vennero eseguite in piastre di perpep secondo la tecnica raccomandata dall'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (1959). Nelle prove di EAI vennero usate 8 unità emoagglutinanti di virus.

Verifica della termoresistenza dell'emoagglutinina.

Il virus, diluito 1/5 in soluzione tampone, venne distribuito in vari contenitori, mantenuti alla temperatura di 56°C o di 60°C per vari intervalli di tempo. Il titolo EA venne controllato prima dell'inizio dell'esperimento e allo scadere dei vari intervalli.

Verifica della sensibilità dei ceppi agli inibitori dei sieri.

Diluizioni scalari dei sieri furono cimentate con 8 unità EA di virus. La sospensione di emazie di pollo venne aggiunta dopo 10 minuti di contatto fra siero e virus. Come titolo dell'inibitore venne considerata la più alta diluizioni di siero che inibiva l'EA.

Verifica della sensibilità dei ceppi all'inibitore dell'albume dell'uovo.

Diluizioni scalari dell'inibitore vennero messe a contatto con 8 unità EA del virus diluito 1/2 e riscaldato per 30 min a 56°C . Dopo 10 min vennero aggiunte le emazie di pollo.

Verifica dell'antigenicità e reazioni crociate.

Con i sieri immuni vennero eseguite reazioni di EAI contro il ceppo omologo ed i ceppi eterologhi.

Verifica della capacità di agglutinare le emazie di varie specie animali.

Le reazioni vennero eseguite con la tecnica già indicata, adoperando sia virus purificato, sia non purificato, e leggendo i risultati dopo permanenza delle piastre a temperatura ambiente e a + 4°C.

Verifica dell'attività enzimatica.

Campioni dei tre ceppi vennero adsorbiti su emazie di pollo, aggiungendo a 2 ml di virus 0.10 ml di emazie di pollo ammassate. Dopo 1h di permanenza a + 4°C, i campioni vennero centrifugati e venne separato e titolato il supernatante. Il sedimento di emazie venne risospeso in 2 ml di soluzione tampone preriscaldata e tenuto in agitatore meccanico a 37°C. A vari intervalli di tempo venne verificata l'attività enzimatica titolando il virus eluito.

Verifica dell'eterogenicità dei ceppi.

I tre ceppi vennero titolati in uova contemporaneamente in presenza e in assenza di siero normale di cavallo, secondo la tecnica di CHOPPIN & TAMM (1960).

Infettività per l'uovo.

Diluizioni logaritmiche in base 10 dei tre ceppi vennero inoculate nella cavità allantoidea di 4 uova in 10^a giornata. Dopo 48h d'incubazione venne stabilito il numero delle uova infette. L'infettività (DIU 50) venne calcolata con il metodo di REED & MUENCH.

Infettività per i topi.

I liquidi allantoidei infetti, con titolo EA di 1/128, vennero inoculati per via intranasale in topi anestetizzati con etere, nella dose di 6 gocce per ogni animale. Dopo tre giorni i topi vennero sacrificati e con i polmoni prelevati vennero eseguiti ulteriori passaggi in topo.

RISULTATI

Termoresistenza dell'emoagglutina.

I dati riguardanti questo marker sono sintetizzati nelle Fig. 1, 2 e 3: da esse risulta che il potere EA dei tre ceppi esaminati non venne abolito dal calore a 56°C e a 60°C per tutta la durata del periodo di osservazione. I titoli EA controllati durante questo periodo mostrarono tuttavia un andamento particolare: ad esempio il virus Hong Kong, con titolo iniziale di

1/120, dopo 30 minuti di riscaldamento a 56°C, aveva un titolo di 1/80; il titolo risalì poi a 1/160 dopo 60 minuti. Negli intervalli successivi, il titolo risultò di 1/120, ma risalì nuovamente a 1/160 dopo 3h. Lo stesso fenomeno si

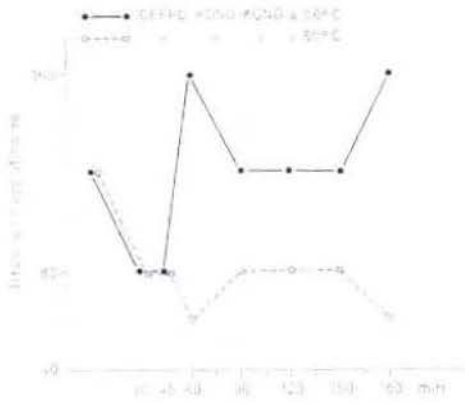


Fig. 1. — Variazioni del titolo emoagglutinante in funzione del tempo di esposizione a temperature di 56° e 60°C (ascisse) nel ceppo Hong Kong.

verificò per il ceppo Aichi, che aveva un titolo iniziale di 1/320. Il titolo calò a 1/160 dopo 45 minuti di riscaldamento a 56°C, ma risalì a valori da

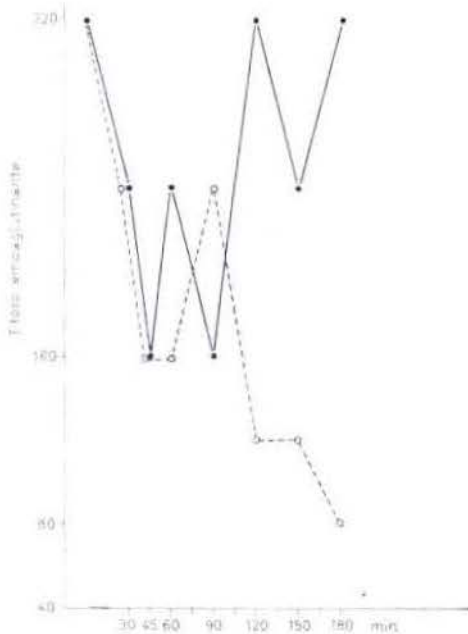


Fig. 2. — Variazioni del titolo emoagglutinante in funzione del tempo di esposizione a temperature di 56°C (●—●) e 60°C (○---○) nel ceppo AICHI.

1/240 a 1/320 dopo 60, 120 e 180 minuti. Per l'A2/England/68 l'aumento del titolo venne messo in evidenza solo dopo l'intervallo di 2h.

A 60°C il fenomeno fu meno evidente. Dopo un calo iniziale del titolo EA, si osservò, per tutti e tre i ceppi, un aumento dopo 90 minuti; in seguito il titolo diminuì progressivamente per tutta la durata dell'esperimento, con una sola eccezione, rappresentata dal ceppo A2/England/68, il cui titolo EA aumentò ancora nella prova finale. Queste prove vennero eseguite anche con virus purificato e si osservarono gli stessi risultati.

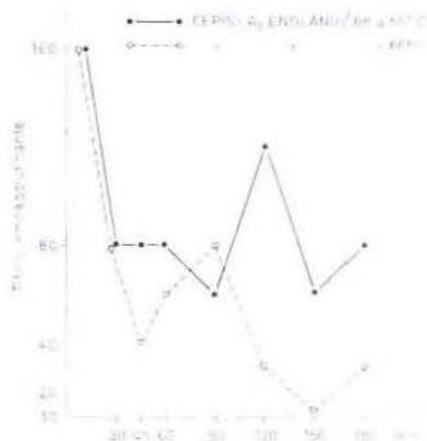


Fig. 3. — Variazioni del titolo emoagglutinante in funzione del tempo di esposizione a temperature di 56° e 60°C (ascisse) nel ceppo A2/England 68.

I campioni dei tre ceppi trattati con il calore a 56°C, vennero inoculati in uova per controllarne l'infettività. Il titolo infettante risultò già molto ridotto dopo 30 minuti, negli intervalli successivi si ebbe la scomparsa dell'infettività. Nessun rialzo dell'infettività fu osservato nei campioni in cui vi era stato un aumento del titolo EA.

Sensibilità agli inibitori dei sieri di coniglio e cavallo (Tab. 1 e 2).

I tre ceppi esaminati si dimostrarono sensibili e nessuna differenza significativa fu riscontrata fra di loro a questo riguardo. Per i sieri di coniglio le prove vennero eseguite anche con i virus purificati, con risultati del tutto identici.

Sensibilità agli inibitori dell'albumine dell'uovo.

Tutti e tre i ceppi si mostrarono sensibili all'inibitore dell'albumine dell'uovo; il ceppo A2/England/68 mostrò una sensibilità lievemente maggiore.

Potere EA verso le emazie di varie specie animali.

Tutti e tre i ceppi agglutinavano le emazie di pollo, cavia, topo, uomo, montone, scimmia, e non agglutinavano quelle di cavallo, mucca e vitello (Tab. 3). Le emazie di pollo, cavia, uomo, montone e scimmia vennero agglutinate a titolo più alto a temperatura ambiente che non a + 4°C. È da

TABELLA I.

Sensibilità dei vari ceppi di virus agli inibitori dell'emoagglutinazione presenti nel siero di cavallo. Titolo massimo del siero capace di inibire 8 unità E. A. di virus.

Siero No.	Siero	Virus		
		Hong Kong	Aichi	A2/England/68
1	non trattato	1/160	1/160	1/80
	inattivato	1/40	1/80	1/80
2	non trattato	1/320	1/320	1/640
	inattivato	1/640	1/640	1/640
3	non trattato	1/640	1/640	1/640
	inattivato	1/320	1/320	1/320
4	non trattato	1/1280	1/1280	1/1280
	inattivato	1/1280	1/1280	1/1280
5	non trattato	1/1280	1/1280	1/1280
	inattivato	1/1280	1/1280	1/1280
6	non trattato	1/1280	1/1280	1/1280
	inattivato	1/1280	1/1280	1/1280
7	non trattato	1/1280	1/1280	1/1280
	inattivato	1/1280	1/1280	1/1280

notare che l'azione EA verso le emazie di cavallo, mucca e vitello era diversa negli altri ceppi usati come termine di paragone (Tab. 4). Così ad esempio, i ceppi A2/England/64, A2/Roma/68, A2/Singapore e A2/Roma/65 agglutinavano anche le emazie di cavallo, ed i ceppi A2/Roma/68 e A2/Singapore agglutinavano anche quelle di vitello e di mucca. Tutti e due i ceppi di virus influenzale B agglutinavano sia le emazie di cavallo, sia quelle di mucca e vitello.

Per i tre ceppi A2/Hong Kong, A2/Aichi, e A2/England/68, le prove di EA vennero eseguite anche col virus purificato, ed i risultati furono identici.

TABELLA 2.

Sensibilità dei vari ceppi di virus agli inibitori dell'emoagglutinazione presenti nel siero di coniglio. Titolo massimo del siero capace di inibire 8 unità E. A. di virus.

Siero No.	Virus					
	Hong Kong		Aichi		A2 England 68	
	Non trattato	Purificato	Non trattato	Purificato	Non trattato	Purificato
1	1/80	1/40	1/20	1/20	1/20	1/40
2	1/160	1/40	1/40	1/40	1/20	1/40
3	1/160	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40
4	1/160	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40
5	1/160	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40
6	1/160	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40

Attività enzimatica.

L'attività enzimatica dei tre ceppi in studio non risultò diversa e apparve per tutti e tre, debolissima e tardiva. Infatti dopo 5h di permanenza a 37°C, in agitatore, il titolo EA del virus eluito era solo un ventesimo di quello iniziale.

Antigenicità dei ceppi.

I tre ceppi mostrarono uguale potere antigene: anche la diluizione 1/125 determinò la formazione di anticorpi. Le prove crociate non misero in evidenza alcuna differenza antigenica fra i ceppi.

Infettività per l'uovo e per il topo.

I titoli infettanti per l'uovo furono rispettivamente $10^5/0,20$ ml nel ceppo Hong Kong, $10^6/0,20$ ml nell'Aichi, e $10^{5,75}/0,20$ ml nell'A2/England/68.

Nei topi vennero eseguiti solamente tre passaggi ciechi, senza che si notasse alcun adattamento. Al primo passaggio si osservarono zone di epatizzazione polmonare in tutti gli animali sacrificati, ma nei successivi due passaggi tale reperto diminuì notevolmente d'intensità.

TABELLA 3.

Titolo emoagglutinante dei diversi virus nei confronti delle emazie di diverse specie a temperatura ambiente (T.A.) ed a 4°C.

Virus	E m a z i e																	
	Pollo		Cavia		Rhesus		Uomo		Topo		Montone		Cavallo		Mucca		Vitello	
	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C	T.A.	4°C
Hong Kong	1/160	1/120	1/160	1/120	1/60	1/120	1/80	1/60	1/60	1/120	1/80	1/40	0	0	0	0	0	0
Aichi	1/640	1/240	1/240	1/160	1/80	1/60	1/80	1/60	1/12	1/160	1/180	1/60	0	0	0	0	0	0
A2/England/68	1/80	1/60	1/80	1/60	1/20	1/15	1/40	1/30	1/60	1/30	1/20	1/20	0	0	0	0	0	0

TABELLA 4.

**Titolo emoagglutinante dei diversi virus di paragone,
nei confronti delle emazie di diverse specie a temperatura ambiente.**

Virus	Pollo	Montone	Cavallo	Mucca	Vitello
Hong Kong	1/160	1/20	0	0	0
Aichi	1/320	1/40	0	0	0
A2/England/68	1/160	1/20	0	0	0
A2/England/64	1/40	1/20	1/10	0	0
A2/Singapore	1/160	1/80	1/80	1/40	1/40
A2/Roma/68	1/20	1/10	1/10	1/20	1/20
A2/Roma/65	1/40	1/10	0	0	0
A2/Roma/65 (26P)	1/80	1/20	0	0	0
B/Roma/67	1/80	1/20	1/20	1/20	1/40
B/Joanneshurg	1/80	0	1/40	1/40	1/40

Dimostrazione dell'eterogeneità dei ceppi.

Le ricerche eseguite dimostrarono la composizione eterogenea delle popolazioni virali. Infatti il titolo infettante dei ceppi inoculati dopo contatto dei virus per un'ora con siero di cavallo, risultò sempre nettamente inferiore al titolo infettante ottenuto con i virus originali. Le differenze variarono da 1,5 a 2,25 log (Tab. 5).

TABELLA 5.

**Variazioni del titolo infettante di diversi ceppi
dopo contatto per 1 ora con siero di cavallo**

Virus	Titolo virus	Titolo virus + siero cavallo
Hong Kong	10 ⁵	10 ^{3,25}
Aichi	10 ⁶	10 ^{3,75}
A2/England/68	10 ^{5,75}	10 ^{4,25}

DISCUSSIONE

Prendendo in esame i tre ceppi di virus A2 isolati nel 1968, in luoghi e tempi diversi, e perciò, presumibilmente, dopo che avevano subito un diverso numero di passaggi nell'ospite umano, ci si poteva aspettare di trovare diversità nelle loro caratteristiche biologiche. È noto, infatti, che alcune proprietà, quali, ad esempio, la sensibilità agli inibitori o l'attività enzimatica, possono variare dopo ripetuti passaggi su ospiti diversi (JAMES & FISET, 1959; COHEN & BIDDLE, 1960), dato che tali passaggi favoriscono la selezione di una parte della popolazione virale eterogenea. Contrariamente alle nostre aspettative tali differenze non furono messe in luce.

Infatti i marker presi in considerazione (termoresistenza dell'emoagglutinina, sensibilità agli inibitori, azione agglutinante su emazie di specie diverse, attività enzimatica) non hanno evidenziato alcuna differenza fra questi tre ceppi.

Ci sembrano di qualche interesse i risultati degli esperimenti sulla termoresistenza dell'emoagglutinina. Tutti e tre i ceppi mostrarono un abbassamento del titolo EA dopo 30 minuti di permanenza a 56°C o a 60°C, ed in seguito un aumento dello stesso, ad intervalli di tempo variabili da ceppo a ceppo: in un solo caso si raggiunse un valore superiore a quello del titolo iniziale. Questi risultati furono confermati dalle osservazioni successive. È possibile che una disgregazione iniziale della emoagglutinina, seguita dal fenomeno segnalato da ECKERT (1967) e cioè dalla riassociazione spontanea delle subunità proteiche dell'emoagglutinina in macromolecole attive possa spiegare queste variazioni. È possibile anche che vi sia una temperatura ottimale per il verificarsi del fenomeno. Infatti esso apparve più frequentemente e più evidentemente dopo trattamento a 56°C che non a 60°C. L'infettività dei virus risultò diminuita dopo 30 minuti di permanenza a 56°C e, negli intervalli successivi, risultò totalmente annullata.

Diversi autori (BURNET, 1943; HIRST, 1947; TAMM, 1954; VEERARAGHAVAN & KIRTIKAR, 1961; WONG & KILBOURNE, 1961; RATHOVA *et alii*, 1968) hanno preso in considerazione l'utilità di determinare il potere agglutinante di ceppi diversi verso emazie di specie differenti. I dati ricavati nei nostri esperimenti confermano questa opinione e dimostrano che i tre ceppi presi in esame sono diversi dagli altri ceppi A2 esaminati. Dalle titolazioni eseguite in presenza di siero di cavallo si può rilevare che tutti e tre i ceppi erano composti di una popolazione eterogenea. Infatti l'infettività dei singoli ceppi non venne abolita totalmente, come sarebbe dovuto avvenire se tutte le particelle virali fossero state sensibili all'azione neutralizzante dell'inibitore. D'altra parte i titoli infettanti non furono uguali a quelli della titolazione eseguita in assenza del siero, come sarebbe avvenuto se tutte le particelle fossero state insensibili. La riduzione di titolo nella tito-

lazione effettuata in presenza del siero, fu diversa per i tre ceppi, il che dimostra che la proporzione fra i due tipi di particelle (sensibili e insensibili) variava nei diversi ceppi. È possibile che, nei successivi passaggi che avverranno, sia in laboratorio, sia nell'ospite umano, un tipo di particelle abbia il sopravvento sull'altro tipo. Se un tale mutamento si verificasse dovrebbe essere possibile metterlo in evidenza con i metodi da noi usati, confrontando le caratteristiche dei ceppi attuali con quelli ottenuti sia sperimentalmente, sia in dipendenza di una variabilità naturale.

3 aprile 1969.

BIBLIOGRAFIA

- BURNET, F.M. & D.R. BULL, 1943. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **21**, 55.
 BURNET, F.M. & P.E. LIND, 1954. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **32**, 711.
 CHOPPIN, W.P., S. OSTERHOUT & J. TAMM, 1958. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **98**, 513.
 CHOPPIN, W.P. & J. TAMM, 1960. *J. Exptl. Med.*, **112**, 895.
 CHOPPIN, W.P. & J. TAMM, 1964. *Cellular Biol. Myxovirus Infection*, p. 218, *Ciba Found. Symp.*
 COHEN, A. & F. BIDDLE, 1960. *Virology*, **11**, 658.
 DRAKE, J.W. & P.A. LAY, 1962. *Virology*, **17**, 56.
 ECKERT, E.A., 1967. *J. Virol.*, **1**, 920.
 HIRST, G.K., 1947. *J. Exptl. Med.*, **86**, 357.
 JAMES, M.S. & P. FISET, 1959. *Nature*, **184**, 1656.
 LEVY, A.H. & R.R. WAGNER, 1958. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **98**, 357.
 ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 1959. *Serie Rap. Techniques*, N° 170, p. 48.
 RATHOVA, V., D. KOCISKOVA, O. KRIZANOVA & L. BORECKY, 1968. *Acta Virol.*, **12**, 420.
 REED, L.J. & H. MUENCH, 1938. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493.
 SIMPSON, R.W. & R.E. HAUSER, 1966. *Virology*, **30**, 484.
 SOKOLOV, M.I. & N.P. OBROSOVA SEROVA, 1963. *Vopr. Virusol.*, **8**, 281.
 STENBACK, W.A. & D.P. DURAND, 1963. *Virology*, **20**, 545.
 TAMM, J. 1954., *J. Immunol.*, **73**, 190.
 TUCKOVA, E., V. VONKA & M. STAREK, 1968. *Acta Virol.*, **12**, 316.
 VEERARAGHAVAN, N. & M.W. KIRTIKAR, 1961. *Bull. World Health Organ.*, **24**, 687.
 VONKA, V., E. TUCKOVA & J. BRAUEROVA, 1968. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **23**, 388.
 WONG, S.C. & E.D. KILBOURNE, 1961. *J. Exptl. Med.*, **113**, 95.