

I Sessione: *Virologia*

Relazione

Fattori virali intrinseci e co-fattori microambientali estrinseci nelle fasi precoci della eritroleucemia da virus di Friend

GIOVANNI BATTISTA ROSSI (a) e CESARE PESCHLE (b)

(a) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali; (b) Laboratorio di Patologia non Infettiva, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Sono state studiate le fasi precoci (fino a 21 giorni dall'inoculo virale) della eritroleucemia indotta dai due ceppi (policitemico, FLV-P, ed anemico, FLV-A) del virus di Friend. Sono state approfondite la cinetica ed i requisiti ormonali necessari per lo sviluppo ottimale di «bursts» (BFU-E) e colonie (CFU-E) eritroidi così come di colonie mielomacrogagiche (GM-CFU). L'FLV-P consiste di un virus competente alla replicazione (F-MuLV), capace di indurre da solo una eritroleucemia in topini neonati suscettibili, e di funzionare da «helper» per l'altro genoma virale «difettivo» (SFFV), che invece è responsabile della comparsa di foci di eritroblastosi al di sotto della capsula splenica 9 giorni dopo l'inoculo. L'FLV-P induce una eritroleucemia con epatosplenomegalia, eritroblastosi e policitemia. L'FLV-A, invece, causa la comparsa della stessa forma di eritroleucemia ma accompagnata da severa anemia. Esso consiste dello stesso F-MuLV (o di un virus estremamente simile ad esso) competente per la replicazione e capace di indurre un'eritroleucemia. Sono inoltre presenti nell'FLV-A sequenze SFFV-simili che apparentemente non sono compiutamente espresse a livello biologico.

E' stato osservato che:

a) BFU-E spleniche o midollari da topi infettati con FLV-P o -A, sono parzialmente indipendenti dall'aggiunta in piastra di BPF (burst-promoting factor(s), una glicoproteina di 24.000 daltons), la cui presenza è invece un requisito fondamentale per la clonazione delle BFU-E da topi normali;

b) la frazione di BFU-E ancora dipendenti dall'aggiunta di BPF mostrano, però, una spiccata ipersensibilità al BPF stesso;

c) nei supernatanti di colture di splenociti da topi infettati con FLV-P o -A, vengono rilasciati, in assenza di alcun stimolo da lectine esogene (Concanavalina A, etc.), fattori BPF-simili;

d) la crescita delle CFU-E da splenociti di topi infettati con FLV-P è totalmente indipendente dall'aggiunta in piastra di eritropoietina, anche in condizioni di coltura prive di siero fetale bovino.

A fronte di modifiche profonde a carico delle BFU-E e CFU-E di milza e midollo osseo di topini infettati con l'uno o l'altro dei due virus, stanno l'assoluta mancanza di simili alterazioni per quanto riguarda i progenitori della serie

mielomacrogagica, e cioè: GM-CFU spleniche o midollari di topi infetti sono sempre e completamente dipendenti dall'aggiunta del o dei fattori (GM-CSF) che sono necessari per lo sviluppo fisiologico delle colonie mielo-macrogagiche. Inoltre quei supernatanti contenenti attività BPF-simili sono totalmente sprovvisti di attività GM-CSF-simili.

Questi dati sono compatibili con la contemporanea presenza ed interazione di I) meccanismi intrinseci al o ai genomi virali coinvolti (vedi maggiore sensibilità delle BFU-E al BPF esogeno) e II) meccanismi, presumibilmente virus-indotti, ma estrinseci al fenomeno «trasformazione» in sé e per sé, e probabilmente a sede nel complesso T linfociti-macrofagi, che sono i principali produttori di attività tipo BPF.

Viene proposto un modello patogenetico delle prime fasi della eritroleucemia di Friend che tiene conto dei due possibili meccanismi suaccennati, e cioè:

a) in una primissima fase, l'F-MuLV si replica attivamente anche nel complesso T linfociti-macrofagi, determinandone l'attivazione e la conseguente iperproduzione di fattori tipo BPF;

b) il BPF prodotto stimola alla proliferazione (fase S) le BFU-E spleniche e midollari, che, proprio perché in replicazione, vengono preferenzialmente infettate e «trasformate» dall'F-MuLV;

c) le BFU-E infettate e «trasformate» continuano ad essere modulate verso la serie eritroide dalla contemporanea presenza nel microambiente splenico o midollare di BPF (vedi a), al quale, fra l'altro, sono diventate estremamente sensibili in virtù della «trasformazione» indotta dal virus;

d) a questa eritropoiesi virus-modulata manca, nel caso dell'FLV-A, il fattore differenziativo tardivo, l'eritropoietina, per cui gli eritroblasti accumulatisi specie nella milza non maturano completamente, e quindi si ha anemia;

e) nel caso dell'infezione da FLV-P, invece, lo stimolo eritropoietino-simile è fornito dalla componente virale SFFV, che trasforma l'eritropoiesi da inefficace in efficace, quindi terminale, con conseguente policitemia.

Summary (Virus-versus Microenvironmental Factors in the Early Stages of Friend Virus-induced Erythro-leukemia). - The kinetics and the hormonal requirements

of erythroid «bursts» (BFU-E) and colonies (CFU-E) as well as of granulomonocytic colonies (GM-CFU) have been studied during the early stage (up to 21 days) of the erythro-leukemia induced by the polycythemic (FLV-P) and the anemic (FLV-A) strain of Friend Virus. Both strains induce the same type of erythro-leukemia with hepatosplenomegaly, erythroblastosis and polycythemia in the first instance, but with anemia in the case of FLV-A. Both strains contain a helper-independent, replication-competent leukemogenic virus (F-MuLV) which is able per se of inducing an erythro-leukemia accompanied by anemia. FLV-P stocks also contain a defective spleen focus-forming component (SFFV) which is obviously dependent on the previous or on any competent virus for its replication. SFFV induces the formation of erythroid foci beneath the splenic capsula, and, in general, is a potent stimulus for an effective erythropoiesis. In FLV-A, instead, SFFV-related sequences are present, but they appear not to be biologically expressed. Our findings can be summarized as follows:

a) splenic or marrow BFU-E from FLV-P or -A-infected mice, are at least in part independent of the exogenous addition of BPF (Burst-promoting factor(s), a 24K glycoprotein), which is an absolute requirement for the growth of BFU-E from normal mice;

b) the BFU-E fraction still dependent upon BPF addition exhibits a pronounced hypersensitivity to BPF itself;

c) supernates of cultures of splenocytes from FLV-P- or -A-infected mice apparently contain factors endowed with BPF-like activity. These cultures had not been stimulated by any lectin (Con A, etc);

d) CFU-E growth from spleens of FLV-P (but not of FLV-A) infected mice are totally independent of the addition of Erythropoietin, even under stringent culture conditions (total replacement of fetal calf serum).

In face of these profound changes of the biology of BFU-E and CFU-E from spleen and marrow of mice given either virus strain, splenic or marrow GM-CFU from virus-infected mice are always fully dependent upon the exogenous addition of their physiologic stimulatory factor(s) (GM-CSF). Moreover, the above-described supernates containing BPF-like activity were absolutely void of any GM-CSF-like activity.

These data lend support to the simultaneous presence and interaction of mechanisms of intrinsic [i.e. directly related to the expression of viral gene(s)] and extrinsic (i.e. not directly related to the expression of viral gene(s), albeit triggered by the virus infection of splenic or marrow microenvironmental T lymphocytes-macrophage complex) type. The former may mediate the BFU-E hypersensitivity to BPF, whereas the latter may be responsible of the release of BPF-like activity in cultures of infected splenocytes.

The following pathogenetic model may underlie the early stages of Friend erythro-leukemia:

a) shortly after infection, F-MuLV infection of T lymphocyte-macrophage complex leads to its activation and consequent production of BPF-like factors;

b) these, in turn, may sharply increase BFU-E cycling both in spleen and in marrow, rendering BFU-E more susceptible to F-MuLV infection and transformation;

c) infected and transformed BFU-E will be continuously modulated into the erythroid pathway because of the sustained

production of BPF, to which transformed BFU are extremely sensitive;

d) in FLV-A-infected mice, erythroblasts accumulating in the spleen following the maturation of BFU-E will miss the late differentiative step, induced by erythropoietin; anemia will thus ensue;

e) the erythropoietin-like stimulus is, instead, provided by SFFV in FLV-P-infected mice: erythropoiesis will turn from ineffective into effective and terminal, with the obvious polycythemia.

Si ritiene generalmente che il meccanismo «tipo gene *src*» del virus del sarcoma di Rous possa essere esteso a tutte le forme di leucemia sperimentale da Retrovirus, o almeno a quelle ad insorgenza rapida. Sono stati isolati, in verità, geni trasformanti simili al *src* in altre forme di leucemie acute aviarie (*erb*, *myc*, etc). Non è stato però isolato alcun gene di questo tipo nel caso delle eritroleucemie acute causate dai ceppi policitemico (FLV-P) ed anemico (FLV-A) del virus di Friend.

A tutt'oggi si conoscono fondamentalmente le seguenti caratteristiche di questi due ceppi: l'FLV-A, originariamente isolato da Charlotte Friend, induce una rapida leucemia eritroide con epatosplenomegalia, eritroblastosi e profonda anemia, in assenza di tumori timici o comunque di neoplasie linfocitarie [1]. L'FLV-P, isolato causalmente da E. Mirand alcuni anni dopo, induce la stessa forma di leucemia eritroide, che è associata, invece, ad una spiccata policitemia [2]. Recenti studi del gruppo di E. Scolnick [3-7], che facevano seguito ad altri di C. Friend [8], hanno messo in evidenza che:

a) il genoma clonato del virus competente per la replicazione (designato F-MuLV) è capace di indurre in topini neonati suscettibili una forma di eritroleucemia acuta con anemia del tutto sovrapponibile a quella indotta da FLV-A;

b) il genoma corrispondente alla componente virale difettiva (SFFV, spleen focus-forming virus, presente ed attivo nell'FLV-P, ma inattivo nell'FLV-A) veniva anch'esso clonato in pBR322 e successivamente recuperato attraverso cotransfezione con DNA del virus F-MuLV o di altri virus leucemogeni murini. Il genoma SFFV così recuperato era in grado, nell'ambito della leucemia indotta dal virus competente, di indurre foci di eritroblastosi splenica e, più in generale, di indurre un'attiva stimolazione dell'eritropoiesi fino alla comparsa di una policitemia.

In questo contesto rimangono ancora da definire alcuni punti essenziali. Quale è il ruolo del F-MuLV, che è in grado da solo di indurre una leucemia eritroide? In particolare, è riconoscibile in questo virus un gene specifico capace di sollecitare l'eritropoiesi con meccanismo *intrinseco*, ovvero esso agisce anche tramite meccanismi *estrinseci*, e cioè inducendo la produzione di fattori esogeni stimolanti l'eritropoiesi? Ed, infine, in che modo il SFFV esercita uno stimolo efficace dell'eritropoiesi?

Meccanismi in gioco nella eritroleucemia indotta da F-MuLV, e comuni alla malattia da FLV-A e FLV-P. - Le nostre indagini sono state focalizzate sulla fase precoce della malattia. In precedenti lavori [9-11] avevamo

dimostrato che a 7-14 giorni dall'inoculo virale le BFU-E (Burst-forming Units-Erythroid), progenitori scarsamente differenziati della serie eritroide, sono in fase S e, pertanto, il pool dei progenitori è in spiccata attività proliferativa. Tale attività risultava nettamente inferiore nei tipi non infettati. Per contro, la proliferazione dei progenitori della serie mielomacrogagica (GM-CFU, Granulo-Monocytic Colony-forming Units) non era significativamente aumentata nei topi infetti. La cinetica delle BFU-E è controllata da una glicoproteina di 24.000 daltons (BPF), che verosimilmente è distinta dal GM-CSF (Granulo-Monocytic Colony-stimulating Factor), a sua volta responsabile della modulazione delle GM-CFU.

Di fronte al selettivo aumento dell'attività proliferativa dei progenitori « rossi », abbiamo ipotizzato che tale fenomeno fosse da riferire ad un aumento dell'attività del BPF. A confronto di quest'ipotesi abbiamo osservato che la proliferazione *in vitro* delle BFU-E da topi iniettati con FLV-A o -P è, almeno in parte, indipendente dall'aggiunta in piastra di BPF. Va sottolineato che questi esperimenti sono stati condotti in colture contenenti solo il 4 % di siero fetale bovino, in quanto quest'ultimo presenta spesso livelli significativi di BPF. È anche essenziale rilevare che il clonaggio delle GM-CFU degli stessi topi virus-infetti era dipendente dall'aggiunta di CSF, come si osserva in condizioni fisiologiche. Soprattutto nel caso di topi infettati con FLV-A, il fenomeno era più evidente per le BFU-E di origine splenica rispetto a quelle midollari, in accordo alla ben nota prevalente espressione splenica della malattia di Friend.

Sul piano teorico, questi risultati si prestano a due possibili interpretazioni, non necessariamente alternative. In primo luogo si può supporre che le BFU-E, infettate dall'F-MuLV divengano, a seguito dell'espressione dei geni virali, iper-responsive allo stimolo del BPF, che verosimilmente è prodotto in piastra in quantità minuscole, dal complesso T linfociti-macrofagi, cosemenzati con le BFU-E stesse [13]. Si tratterebbe quindi di un meccanismo *intrinseco* all'infezione « trasformante » del genoma virale. Un'altra possibilità, invece, è rappresentata dall'iperproduzione di BPF nelle piastre con cellule di topi infetti; in questo caso, però, il fenomeno sarebbe dipendente dall'infezione da parte dell'F-MuLV dei T linfociti-macrofagi.

La seconda ipotesi è in linea con recenti dati della letteratura, che indicano come:

- a) i macrofagi splenici siano le prime cellule ad essere infettate dal virus di Friend [14];
- b) a 24-48 ore dall'infezione con FLV-P o -A, esistano « markers » virali e particelle in fase replicativa nelle cellule epitelio-reticolari del timo, i cui prodotti ormonali circolanti nel siero risultano notevolmente diminuiti [15];
- c) il virus di Abelson induca *in vitro* una doppia popolazione di colonie emopoietiche di natura linfocitaria e eritroide [16].

Abbiamo pertanto effettuato esperimenti volti a verificare la possibile esistenza di un meccanismo *estrinseco*. Sopranatanti di colture di splenociti di topi normali, FLV-A o FLV-P-infetti, sono stati raccolti 5-7 giorni

dopo incubazione a 37° C in assenza di lectine (Concanavalina A, etc.) e saggiati per la loro capacità di indurre crescita di progenitori emopoietici normali in assenza di BPF o CSF esogeni. Quelli di splenociti infetti hanno costantemente indotto un lieve, ma significativo effetto BPF-simile, ma non CSF-simile. Sep-pure l'effetto appaia quantitativamente ridotto, la sua specificità (BPF +, CSF -) avvalorava l'ipotesi che gli splenociti infettati da FLV-P o -A producano fattori BPF-simili.

L'esistenza di una cooperazione cellulare nella patogenesi dell'eritroleucemia di Friend è inoltre sostanziata dall'esame delle regressioni cellule piastrate/colonie ottenute su cellule midollari e splenociti di topi infetti. Per quanto concerne le GM-CFU, le regressioni sono strettamente lineari e, ovviamente, la crescita delle GM-CFU si realizza solo in presenza di CSF esogeno. Nel caso delle BFU-E, un andamento lineare delle regressioni veniva osservato solo nel caso che il BPF fosse stato aggiunto in piastra. In sua assenza, invece, « bursts » eritroidi venivano osservati solo in presenza di un numero elevato di cellule piastrate. Quest'ultimo fenomeno suggerisce che, in assenza di BPF esogeno, una quota di splenociti piastrati produce tale fattore permettendo la crescita dei « bursts » eritroidi.

Questi dati sperimentali, pur non definitivi, suggeriscono che i due meccanismi, *estrinseco* ed *intrinseco*, coesistano in un rapporto forse sinergico. L'aspetto *intrinseco*, oltre ad essere quasi un necessario tributo al ruolo del genoma virale in ogni infezione *trasformante*, viene in questo caso suffragato da altri dati sperimentali. In effetti, curve dose-risposta di progenitori midollari e splenici di topi infetti dimostrano che, accanto alla precaccennata parziale indipendenza delle BFU-E dall'aggiunta di BPF in piastra, questi progenitori dimostrano talora una maggiore sensibilità alle quantità di BPF addizionate, di modo che il « plateau » venga raggiunto a quantità di BPF nettamente inferiori a quelle necessarie in condizioni fisiologiche. Tale fenomeno di ipersensibilizzazione è più evidente nel caso dei progenitori splenici e midollari provenienti da topi infettati con FLV-P, rispetto a quelli inoculati con FLV-A.

Meccanismi in gioco nella eritroleucemia indotta dal FLV-P e cioè da F-MuLV + SFFV. - Il dato biologico che caratterizza i ceppi di FLV con SFFV attivo, rispetto a quelli in cui il SFFV è assente o non attivo, è rappresentato dalla policitemia. Ciò è dovuto al fatto che nel caso dell'FLV-A il processo eritropoietico, pur soggetto ad uno stimolo proliferativo e differenziativo, è parzialmente bloccato a causa dell'assenza della componente SFFV, che, mimando l'azione dell'eritropoietina, è capace di indurre un'eritropoiesi efficace e quindi terminale, donde, in definitiva, la policitemia. La presenza del SFFV nell'FLV-P, o in ogni altro complesso virale leucemogeno murino, è capace di abolire la dipendenza della crescita delle CFU-E (Colony-forming Units-Erythroid) nei confronti dell'eritropoietina. Ciò è stato da noi dimostrato anche in colture siero-prive, in modo da escludere ogni interferenza da parte delle minuscole quantità di eritropoietina eventualmente presenti nel siero stesso.

Questi dati, che avvalorano altri già precedentemente ottenuti da altri ricercatori (per una rassegna, vedi [8]), sembrano assegnare al SFFV un ruolo certo additivo

e forse sinergico nei confronti del complesso di effetti che sono invece riconducibili all'F-MuLV. In altre parole, la presenza del SFFV nel complesso virale rende l'intera stimolazione del sistema eritropoietico più pronunciata da un lato, e terminale, cioè efficace, dall'altro, con sblocco dell'accumulo di eritroblasti nella milza dell'animale leucemico e loro maturazione terminale con immissione massiccia in circolo e conseguente policitemia. È ovvio che l'aggiunta di uno stimolo eritropoietina-simile (SFFV) a quello BPF-simile (F-MuLV) rende più evidenti e nette quelle caratteristiche (tipo BPF-indipendenza) che abbiamo descritto nel precedente capitolo. Si spiega, pertanto, come le osservazioni compiute con l'FLV-P abbiano fornito dati di più sicura demarcazione rispetto a quelli dei controlli di quanto non sia stato possibile, talora, quando è stato adoperato l'FLV-A.

Modello patogenetico delle fasi precoci delle eritroleucemie da virus di Friend. - Il complesso dei dati suesposti si presta alla formulazione di un modello patogenetico delle fasi precoci dell'eritroleucemia di Friend, che, per quanto ipotetico, riveste una qualche importanza, poiché è *alternativo* allo schema classico imperniato sul ruolo necessario e sufficiente giocato da uno o più geni virali «trasformanti» (*src*, *myc*, *erb*, etc.).

In questo modello i meccanismi intrinseci ed estrinseci sopra accennati cooperano sinergicamente in una sequenza temporale del tipo seguente:

a) in una prima fase, l'F-MuLV si replica attivamente anche nel complesso T linfociti-macrofagi, determinandone l'attivazione e la conseguente iperproduzione di fattori tipo BPF;

b) il BPF attiva e stimola la proliferazione delle BFU-E spleniche e midollari, che proprio perché in replicazione [17], vengono preferenzialmente infettate e *trasformate* dall'F-MuLV;

c) le BFU-E infettate e «trasformate» continuano ad essere modulate a differenziare verso la serie eritroide per la persistenza presenza nel microambiente emopoietico di BPF (vedi a), al quale, fra l'altro, sono diventate estremamente sensibili in virtù della «trasformazione» indotta dal virus;

d) nel caso dell'FLV-A, l'eritropoiesi virus-modulata non è soggetta ad un potente stimolo differenziale terminale, mediato dall'eritropoietina, per cui gli eritroblasti immaturi, soprattutto a livello splenico, non differenziano completamente, e ne deriva in definitiva una *anemia*;

e) nel caso dell'FLV-P, invece, l'effetto eritropoietino-simile è fornito dalla componente virale SFFV, sotto forma di ipersensibilità o indipendenza delle CFU-E ed eritroblasti allo stimolo ormonale, per cui ne deriva un'eritropoiesi efficace, con differenziamento terminale e *policitemia*.

I risultati qui menzionati sono stati in parte precedentemente pubblicati (cfr. [9-11], Peschle C. *et al.*, in «Differentiated Functions in Cancer Cells», R. Revoltella *et al.* Eds., Raven Press, New York, 1982, in press) ed in parte sono in corso di pubblicazione su riviste internazionali.

Questo lavoro è stato sovvenzionato dal Consiglio Nazionale delle Ricerche, Progetti Finalizzati «Virus» (Contratto n. 81.01943.84) e «Controllo della crescita neoplastica» (Contratti n. 81.02014.96 e 81.01437.96).

BIBLIOGRAFIA

1. FRIEND, C. 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J. Exp. Med.* **105**: 307-318.
2. MIRAND, E. A., PRENTICE, T. C., HOFFMAN, J. G. & GRACE, J. T. Jr. 1961. Effect of Friend Virus in Swiss and DBA/1 mice on ⁵⁹Fe uptake. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **106**: 423-426.
3. TROXLER, D. H., RUSCETTI, S. K. & SCOLNICK, E. M. 1980. The Molecular Biology of Friend Virus. *Biochem. Biophys. Acta Rev. Cancer.* **605**: 305-324.
4. LINEMEYER, D. L., RUSCETTI, S. K., MENKE, J. G. & SCOLNICK, E. M. 1980. Recovery of biologically active Spleen Focus Forming Virus from molecularly cloned Spleen Focus Forming Virus-pBR322 circular DNA by contransfection with infectious type C retroviral DNA. *J. Virol.* **35**: 710-721.
5. OLIFF, A. I., HAGER, G. L., CHANG, E. H., SCOLNICK, E. M., CHAN, H. W. & LOWE, D. R. 1980. Transfection of molecularly cloned Friend Murine Leukemia Virus DNA yields a highly leukemogenic Helper-independent Type C Virus. *J. Virol.* **33**: 475-486.
6. OLIFF, A. I., LINEMEYER, D. L., RUSCETTI, S. K., LOWE, R., LOWY, D. R. & SCOLNICK, E. M. 1980. Subgenomic fragment of molecularly cloned Friend Murine Leukemia Virus DNA contains the gene(s) responsible for Friend Murine Leukemia Virus-induced Disease. *J. Virol.* **35**: 924-936.
7. RUSCETTI, S. K., FEILD, J. A. & SCOLNICK, E. M. 1981. Polycythaemia- and anaemia- inducing strains of spleen focus-forming virus differ in post-translational processing of envelope-related glycoproteins. *Nature (London)*. **294**: 663-665.
8. FRIEND, C., SCHER, W., TSUEI, D., HADDAD, J., HOLLAND, J. G., SZRAJER, N. & HAUBENSTOCK, H. 1979. Perspectives on Friend Leukemia Virus: pathogenesis *in vivo* and studies on the control of erythroid differentiation *in vitro*. In: *Oncogenic viruses and host cell genes*. Ikawa, Y. & Odaka T. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 279-301.
9. PESCHLE, C., MIGLIACCIO, G., LETTIERI, F., MIGLIACCIO, A. R., CECCARELLI, R., BARBA, P., TITTI, F. L. & ROSSI, G. B. 1980. Kinetics of Erythroid Precursors in mice infected with the anemic or the polycythemic strain of Friend Leukemia Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 2054-2058.

10. ROSSI, G. B. & PESCHLE, C. 1980. Enhanced proliferation and migration of BFU-E, and erythropoietin-independence of CFU-E expression in FLV-infected mice: Comparative studies on anemic and polycythemic strains. In: *In vivo and in vitro Erythropoiesis: the Friend System*. G. B. Rossi (Ed.). Elsevier-North-Holland Publishing Press, Amsterdam, pp. 139-149.
11. ROSSI, G. B. & PESCHLE, C. 1980. Kinetic mechanisms underlying Friend Virus-induced Erythroleukemias. In: *Experimental hematology today*. S. S. J. Baum, G. D. Ledney & D. W. R. van Bekkum (Eds.). Springer Verlag, New York, pp. 175-184.
12. WAGEMAKER, G. 1980. Erythropoietin-independent regulation of early erythropoiesis. In: *In vivo and in vitro Erythropoiesis: the Friend System*. G. B. Rossi (Ed.). Elsevier-North-Holland Publishing Press, Amsterdam, pp. 87-95.
13. PESCHLE, C. 1980. Erythropoiesis. *Ann. Rev. Med.* **31**: 303-314.
14. TONIOLO, A., MATTEUCCI, D., PISTILLO, M. P., GORI, Z. & BENDINELLI, M. 1980. Early replication of Friend Leukemia Viruses in spleen macrophages. *J. Gen. Virol.* **49**: 203-208.
15. TONIETTI, G., ROSSI, G. B., DEL GOBBO, V., ACCINNI, L., RANUCCI, A., TITTI, F., PREMROV, M. G. & GARACI, E. 1983. Effects of *in vivo* Friend Leukemia virus infection on levels of serum thymic factors and on selected T-cell functions in mice. *Cancer Res.* **43**.
16. WANEK, G. L. & ROSENBERG, N. 1981. Abelson Leukemia Virus induces lymphoid and erythroid colonies in infected fetal cell cultures. *Cell*. **26**: 79-89.
17. SUZUKI, S. & AXELRAD, A. A. 1980. *Fv-2* locus controls the proportion of erythropoietic progenitor cells (BFU-2) synthesizing DNA in normal mice. *Cell*. **19**: 225-236.

Comunicazioni

Caratterizzazione biologica ed ultrastrutturale di una linea di coroide umana trasformata da SV 40

GIUSEPPE CARRUBA (a), BRUNO DALLAPICCOLA (b), VIVIANA BRINCHI (c) e CARLO DE GIULI MORGHEN (d)

(a) Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma; (b) Istituto di Genetica Umana, Università di Urbino;

(c) Istituto di Genetica Medica, Università degli Studi, Roma;

(d) Centro del C.N.R. per lo Studio della Farmacologia delle Infrastrutture Cellulari, Milano

Riassunto. - Nel presente lavoro sono state caratterizzate le proprietà biologiche e morfologiche di una linea di cellule di coroide umana immortalata mediante infezione con Simian Virus 40 (SV40). La controparte normale è servita come controllo per i seguenti parametri di trasformazione: a) capacità di dare colonie in agar soffice; b) aspetto morfologico; c) presenza dell'antigene T-nucleare; d) modificazione del cariotipo. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la capacità di crescita illimitata, prerogativa delle linee trasformate, non era accompagnata da variazioni morfologiche evidenti ma solo da variazioni biologiche dovute all'inserimento del genoma virale nel corredo genetico cellulare. L'analisi ultrastrutturale ha confermato l'origine corioidea delle cellule originali (HC) e della linea stabilizzata da esse derivata (HC/SV40) come evidenziato dalla presenza di granuli intracitoplasmatici elettron-densi, tipici della porzione retroveale dell'occhio umano; inoltre, non è stata osservata la presenza di particelle virali.

Summary (Biological and Ultrastructural Properties of a SV40. Transformed, Human Choroid Cell Line). - The biological and morphological properties of a human choroid cell line infected with Simian Virus 40 (SV40) have been characterized. The untransformed counterpart was used as control to study the following transformation parameters: a) cloning ability in soft agar; b) morphology; c) presence of T-antigen; d) caryotype modifications. The results showed that unlimited growth capability was not accompanied by clear-cut morphological changes but only by biological changes induced by insertion of viral genome into host cell DNA. The ultrastructural analysis confirmed that both starting cells (HC) and the transformed derivative (HC/SV40) were of choroid origin as shown by the presence of intracytoplasmic electron-dense granules typical of the retroveal area of human eye. No viral particles were observed in any cell.

INTRODUZIONE.

La disponibilità di linee cellulari umane caratterizzate dalla capacità di crescere in linea continua *in vitro* è stato l'obiettivo di numerosi ricercatori i quali, a questo scopo, si sono avvalsi sia di cellule nor-

mali trasformate da agenti chimici, virus oncogeni o radiazioni [4, 11, 12, 14, 18, 21, 24], sia di cellule neoplastiche derivate da tumori (HeLa). L'utilizzazione di cellule normali all'origine ha sempre portato alla produzione di linee caratterizzate da una limitata capacità proliferativa [8] che poteva, solo temporaneamente, venire prolungata, ma mai immortalata, dall'uso di tecniche di trasformazione *in vitro*; d'altra parte, l'utilizzazione di cellule derivate da tumori originava linee permanenti più o meno sdifferenziate rispetto al tessuto d'origine.

In ambedue i casi, i modelli cellulari ottenuti non potevano essere utilizzati per evidenziare eventuali modificazioni correlate con lo stato di cellula trasformata, in quanto, nel primo caso, il potenziale duplicativo era limitato e, nel secondo caso, non si possedeva la controparte normale. Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare le caratteristiche biologiche, morfologiche e genetiche di una linea cellulare derivata da coroide umana trasformata e immortalata da SV40 (HC/SV40) e della sua controparte normale (HC).

MATERIALI E METODI.

Cellule e Virus. - Le cellule oggetto del nostro studio sono state gentilmente fornite dal Dr. Arrigo Benedetto (Centro di Virologia, Ospedale S. Camillo, Roma). Esse sono state prelevate dalla porzione posteriore del tratto uveale di un occhio, rimosso chirurgicamente da un paziente affetto da oftalmia simpatica post-traumatica. La sospensione cellulare, ottenuta mediante tripsinizzazione, ha rappresentato l'inoculo di partenza (2×10^6 cellule) ed è stata coltivata in Minimal Essential Medium (MEM) addizionato di 20 % di siero fetale di vitello (GIBCO), penicillina (100 unità/ml) e streptomicina (100 µg/ml). Al raggiungimento della confluenza le cellule venivano subcoltivate al rapporto 1:2 e mantenute in terreno di Eagle modificato da Dulbecco (DME), addizionato di siero di vitello fetale (10 %) e antibiotici. Al decimo passaggio, quando le cellule normali iniziavano a mostrare un rallentamento nella loro capacità di duplicazione, una parte di esse venne infettata con 0,5 ml di Simian Virus 40 (SV40) alla

molteplicità di infezione di 25 PFU/cellula. Dopo un periodo di adsorbimento di 2 ore a 37° C, le colture infettate vennero addizionate di terreno fresco e ulteriormente incubate alla stessa temperatura fino alla comparsa dei foci di trasformazione (circa una settimana). Dopo tale periodo le cellule acquisirono una capacità di crescita costante, caratterizzata da un tempo di duplicazione di circa 48 ore. Le cellule normali sono state denominate HC (Human Choroid) mentre quelle trasformate da SV40, HC/SV40.

Crescita in agar soffic e efficienza di clonaggio. - Al fine di selezionare le cellule trasformate e determinare la loro efficienza di clonaggio, venne utilizzata la metodica di Macpherson e Montagniers [13]. A tale scopo, 5×10^3 o 1×10^5 cellule HC e HC/SV40 sospese in 1,5 ml di terreno DME contenente 0,3 % di agar (Bacto Agar Difco), 10 % di siero fetale e antibiotici, vennero stratificate su uno strato di 7 ml di terreno DME completo contenente 0,5 % di Agar in petri da 6 cm di diametro. Le colture vennero quindi incubate a 37° C ed osservate dopo 10-15 giorni; le colonie formate da almeno 100 cellule furono contate mediante osservazione microscopica con l'aiuto di una grigliatura costituita da quadrati di 2 mm di lato.

Determinazione dell'antigene T-nucleare. - La presenza dell'antigene T-nucleare è stata svelata mediante immunofluorescenza indiretta sulle cellule HC e HC/SV40 utilizzando la procedura di Risser e Pollack [19]. A tale scopo le cellule cresciute a semiconfluenza su vetrino vennero fissate in metanolo, asciugate all'aria e incubate a 37° C per 30 minuti con siero di criceto anti antigene T-virale. Dopo lavaggio e reincubazione con γ -globuline fluorescinate di coniglio anti siero di criceto, le cellule erano lavate ed osservate al microscopio a fluorescenza Leitz, equipaggiato con obiettivi ad immersione ad olio.

Microscopia elettronica. - Per l'esame ultrastrutturale, le cellule HC e HC/SV40 cresciute a confluenza su petri di 10 cm di diametro, vennero staccate con rubber policeman, centrifugate a bassa velocità ed il pellet risultante fissato a 4° C per 2 ore in glutaraldeide 2,5 % in tampone fosfati di Sorensen 0,1 M pH 7,2. Dopo due lavaggi nello stesso tampone, il pellet fu postfissato a 4° C per 1 ora in O_3 1 % in tampone di Sorensen, lavato 2 volte e disidratato mediante passaggi successivi in alcool etilico ed epossipropano. L'inclusione fu fatta in Epon 812 e, dopo polimerizzazione a 65° C per 3 giorni, i pezzi inclusi vennero sezionati con ultramicrotomo Reichert, equipaggiato con lama di diamante e le sezioni colorate in acetato di Uranile al 5 % in H_2O e citrato di Pb. L'osservazione fu fatta al microscopio elettronico Philips EM 400.

Analisi citogenetica. - Le preparazioni di cromosomi furono ottenute da cellule in crescita esponenziale dopo trattamento con 5×10^{-7} M di colchicina (Colcemid, Sigma) per 4 ore a 37° C. Dopo trattamento ipotonico con 0,9 % di citrato di Na e fissazione in una miscela di etanolo: acido acetico (3:1) i campioni vennero preparati col metodo del «dropping and foaming» [15]. Per studi di bandeggio, i vetrini furono preparati con i metodi GAG e QFQ [6, 23]. Una serie di colture fu inoltre preparata per bandeggio RBA mediante ag-

giunta di 5-Brdu alla concentrazione finale di 100 μ g/ml durante le ultime 8 ore di sintesi. I vetrini furono quindi colorati con arancio di acridina tamponato. Come controllo, simile tipo di preparazione fu effettuato anche utilizzando i linfociti del paziente.

RISULTATI.

Caratteristiche di crescita e capacità di clonaggio in agar soffic. - Dopo un periodo iniziale di crescita costante, a partire dall'ottavo passaggio le cellule HC iniziarono a rallentare il ritmo di crescita e pertanto, al decimo passaggio, una parte di esse venne infettata con SV40. Mentre le cellule non infettate si bloccavano quasi completamente al decimo passaggio, la controparte infettata riprese il normale ritmo duplicativo di circa 48 ore, a partire dal secondo passaggio dopo l'infezione (12° passaggio dall'inizio della coltura). La morfologia cellulare, che nelle cellule HC era caratterizzata da aspetto poligonale con alta sensibilità all'inibizione da contatto, mutò parzialmente dopo l'infezione con SV40, assumendo un aspetto poligonale più allungato accompagnato dalla perdita della inibizione da contatto. Attualmente, dopo più di cento passaggi, le cellule HC/SV40 mantengono invariate le caratteristiche morfologiche ed il tempo di duplicazione di 48 ore.

Al fine di confermare l'avvenuta trasformazione delle cellule HC/SV40 in seguito all'infezione virale, si è effettuata una prova di efficienza di clonaggio in agar soffic utilizzando due concentrazioni cellulari diverse, 5×10^3 e 1×10^5 cellule (petri da 6 cm di diametro). I risultati sono schematizzati nella Tab. 1, dalla quale si deduce che l'efficienza è in funzione delle concentrazioni usate e raggiunge, alla concentrazione maggiore, una percentuale del 23 %. In nessun caso si è potuto notare un effetto citopatico come conseguenza dell'infezione virale.

Antigene T-nucleare. - Per confermare la correlazione tra stato trasformato delle cellule HC/SV40 e l'infezione con il virus, cellule HC di controllo e cellule HC/SV40 sono state incubate con antisiero di coniglio anti antigene T di SV40 e successivamente con antisiero di criceto anti siero di coniglio fluorescinato. L'osservazione al microscopio a fluorescenza ha dimostrato (Fig. 1) la presenza di una intensa colorazione

Tabella 1. - Crescita di cellule in agar soffic.

TIPO CELLULARE	Numero di cellule seminate (A)	Numero di colonie (B)	B
			A
			%
HC (a)	5×10^3	Nessuna	—
HC	1×10^5	Nessuna	—
HC/SV40 (b)	5×10^3	710	14,21
HC/SV40	1×10^5	23.000	23,00

(a) Le cellule HC erano seminate al 6° passaggio.

(b) Le cellule HC/SV40 erano seminate al 21° passaggio dopo l'infezione.

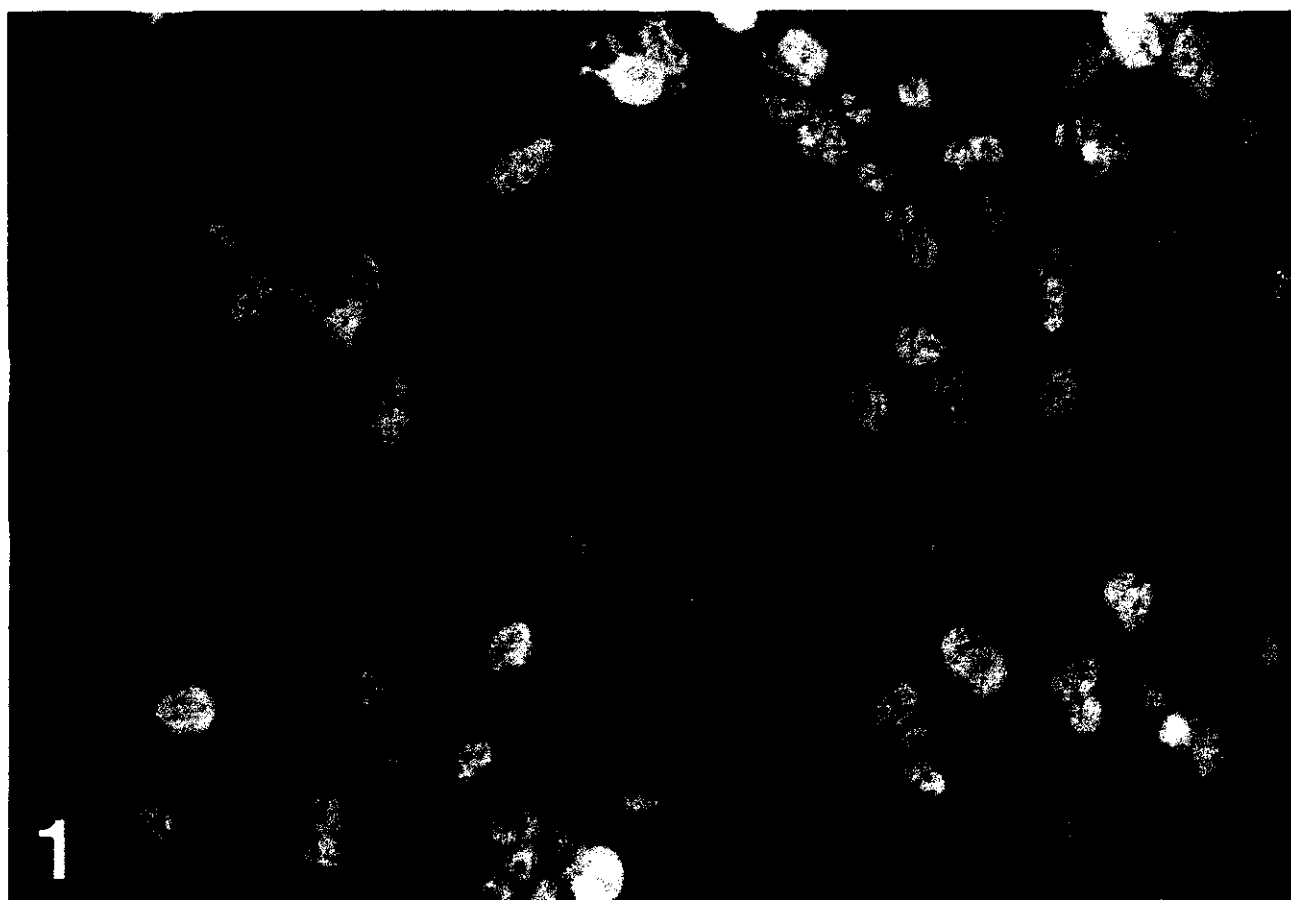


FIG. 1. - Aspetto di cellule HC/SV40 al microscopio a fluorescenza dopo incubazione in siero di coniglio anti SV40 e successiva evidenziazione con antisiero fluorescinato di coniglio antisiero di criceto. Si nota una intensa fluorescenza specifica nei nuclei di tutte le cellule, dimostrazione della presenza dell'antigene T nucleare dell'SV40 ($\times 660$)

nucleare nel 100 % delle cellule HC/SV40; colorazione che risultava invece assente nelle cellule HC e nelle cellule HC/SV40 incubate con siero preimmune.

Analisi ultrastrutturale. - L'esame al microscopio elettronico a trasmissione delle cellule HC e della controparte trasformata HC/SV40 ha messo in evidenza alcune caratteristiche peculiari comuni alle due linee ed altre presenti solo nelle cellule trasformate. La presenza intracitoplasmatica di caratteristici granuli elettro-opachi a struttura lamellare in ambedue le linee cellulari ci ha permesso di confermare la derivazione neurale delle cellule da noi ottenute, a partire dalla porzione retro-veale dell'occhio [9].

L'aspetto generale delle cellule in coltura (Fig. 2) è risultato di tipo poligonale e caratterizzato da un nucleo relativamente grande rispetto al citoplasma circostante. Si è spesso notata una condensazione periferica della cromatina nucleare ed alcuni nuclei contengono nucleoli assai prominenti. In nessun caso sono state osservate giunzioni specializzate ma le cellule sono risultate tra loro separate da lunghi spazi sottili, talora interrotti da microvilli, nelle cellule HC (Fig. 2A), o da larghe lacune nelle cellule HC/SV40 (Fig. 2B). Sia il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) che il complesso di Golgi (GC) sono risultati assai ben sviluppati e situati in posizione paranucleare. L'aspetto dei granuli intracitoplasmatici è evidente nelle Fig. 2C e 2D, relative a cellule HC o HC/SV40 rispettivamente. Nessuna differenza è stata notata nei due stipiti cellulari, né per quanto riguarda la forma né il numero di tali organelli. Dalle immagini menzionate è evidente l'assenza di qualsiasi forma di virus o micoplasma nelle cellule prese in esame.

Analisi citogenetica. - L'esame della distribuzione cromosomiale eseguita sia al 10° che al 36° passaggio ha evidenziato una notevole diminuzione del numero di cellule diploidi, un significativo aumento delle cellule ipoploidi, ed una diminuzione del numero delle cellule iperploidi. Molti riarrangiamenti citogenetici (Fig. 3) come cromosomi dicentrici, cromosomi ad anello, polverizzazioni, figure ad interscambio, furono osservati in preparazioni di cellule HC/SV40 e la loro frequenza aumentava con il numero dei passaggi. La percentuale di cellule con lunghi marcatori cromosomici derivati dal cromosoma n. 1 (1p- e 1q- marcatori) era quasi costante in tutte le preparazioni, mentre la quantità

di cellule con piccoli cromosomi metacentrici diminuiva (Tab. 2). L'analisi citogenetica eseguita sui linfociti del paziente ha rivelato d'altronde un cariotipo normale (dati non mostrati).

DISCUSSIONE.

Numerosi autori hanno dimostrato che il virus oncogeno a DNA SV40 è in grado di trasformare *in vitro* cellule di hamster, topo, coniglio, ratto, scimmia e uomo [1-3, 7, 10, 12, 17, 21, 24], ma, salvo poche eccezioni [5, 20, 22] le cellule così trasformate erano costituite da fibroblasti diploidi. In particolare, venne osservato che cellule derivate da pazienti portatori di anemia di Fanconi [16] e di sindrome di Down [25] risultavano particolarmente suscettibili alla trasformazione con SV40, come pure cellule più differenziate rappresentate da astrociti di cervello fetale umano [5].

Le cellule HC e HC/SV40, da noi utilizzate nel presente lavoro, hanno mostrato un tempo di duplicazione di 48 ore, ma solo il ceppo infettato da SV40 si è dimostrato capace di crescita illimitata. Tale ceppo ha evidenziato numerose delle proprietà caratteristiche delle cellule trasformate, come, ad esempio, la crescita in soffice e la capacità di dare colonie con alta frequenza (23 %). La immunofluorescenza ha dimostrato la presenza dell'antigene T-nucleare nelle cellule HC/SV40, antigene che è risultato assente nelle cellule HC; pertanto, lo stato trasformato delle cellule HC/SV40 è da correlare con l'infezione virale e non con un processo spontaneo di trasformazione. La derivazione delle cellule trasformate dalla controparte normale è avvalorata dalla presenza, in ambedue le linee, dei granuli intracitoplasmatici caratteristici delle cellule retrovirali. L'analisi ultrastrutturale ha inoltre mostrato l'assenza di giunzioni intercellulari specializzate nei due tipi cellulari, anche se la loro disposizione reciproca è in molti casi assai aderente. Nessun virus è apparso rilasciato dalle cellule HC o HC/SV40, né è stato possibile dimostrare la presenza di SV40 in cellule permissive di scimmia CV1, alimentate con il terreno di coltura derivato da cellule HC/SV40. Sulla base di tali risultati, queste cellule sono pertanto da considerarsi non permissive e l'assenza di replicazione virale può essere dovuta o ad un'integrazione parziale del genoma dell'SV40 o ad un efficace meccanismo cellulare di repressione, tipico delle cellule non permissive, come nel caso degli astrociti su menzionati [5].

L'analisi citogenetica ha evidenziato numerose modificazioni cromosomiali a carico delle cellule HC/SV40, il che sta a suggerire l'esistenza di differenti tipi di evoluzione clonale. Il meccanismo con cui l'SV40 è in grado di indurre modificazioni cromosomiche stabili è dovuto ad errori di segregazione durante i vari stadi della mitosi, rottura e fusione, come dimostrato dall'infezione *in vitro* di diverse linee cellulari [26].

In conclusione, il nostro studio ha portato alla stabilizzazione di una nuova linea cellulare umana, di origine corioidea, caratterizzata da un vigoroso potenziale di crescita, che ne facilita la disponibilità per quanto riguarda i già intrapresi studi biochimici e farmacologici.

Il presente lavoro è stato finanziato dal Progetto Finalizzato del C.N.R. «Controllo della crescita neoplastica», Contratto n. 82.00346.96.

Tabella 2. - Preparazioni cromosomiali in passaggi successivi.

FIGURE CITOGNETICHE	10°	20°	30°	40°
Dicentrici	12	43	51	55
Cromosomi ad anello	2	5	6	8
Polverizzazioni	2	5	7	10
Figure di interscambio	—	8	9	12
Marcatori 1p - o 1q -	7	5	7	8
Piccoli marcatori metacentrici ...	8	4	2	—

Frequenze in percentuali di anomalie cromosomiche messe in evidenza in preparazioni derivate da cellule HC/SV40.

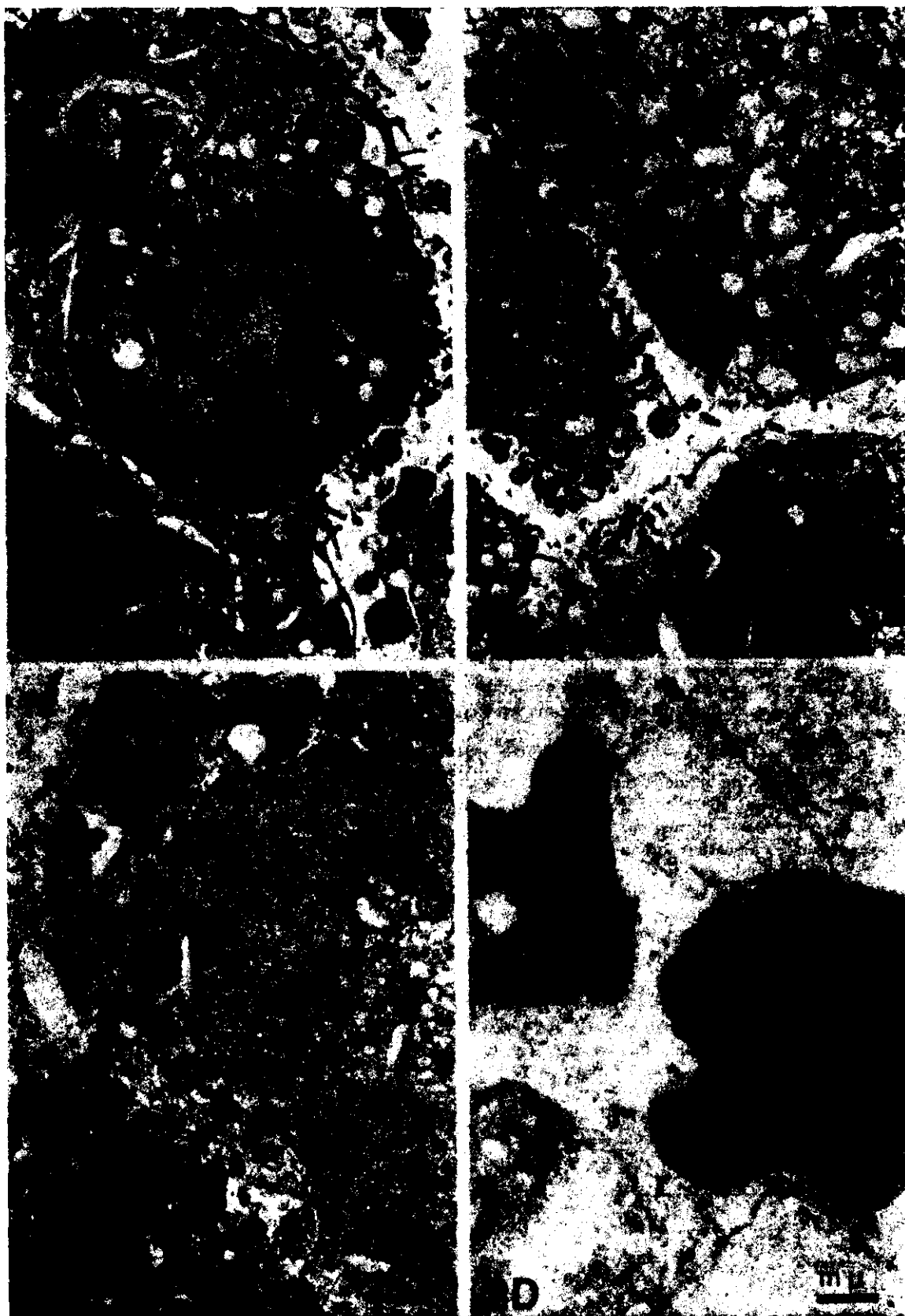


FIG. 2. - Aspetto ultrastrutturale di cellule HC (2A) e HC/SV40 (2B). Da notare in ambedue le linee cellulari l'assenza di particelle virali, la presenza di granuli intracitoplasmatici elettrondensi tipici delle cellule retrovirali e gli spazi intercellulari che, nelle cellule normali HC appaiono ristretti, mentre nelle cellule trasformate HC/SV40 risultano allargati a formare lacune. I nuclei multilobati occupano gran parte del citoplasma cellulare. La disposizione (2C) e la struttura fine lamellare (2D) dei granuli intracitoplasmatici ne confermano la natura non lisosomiale.

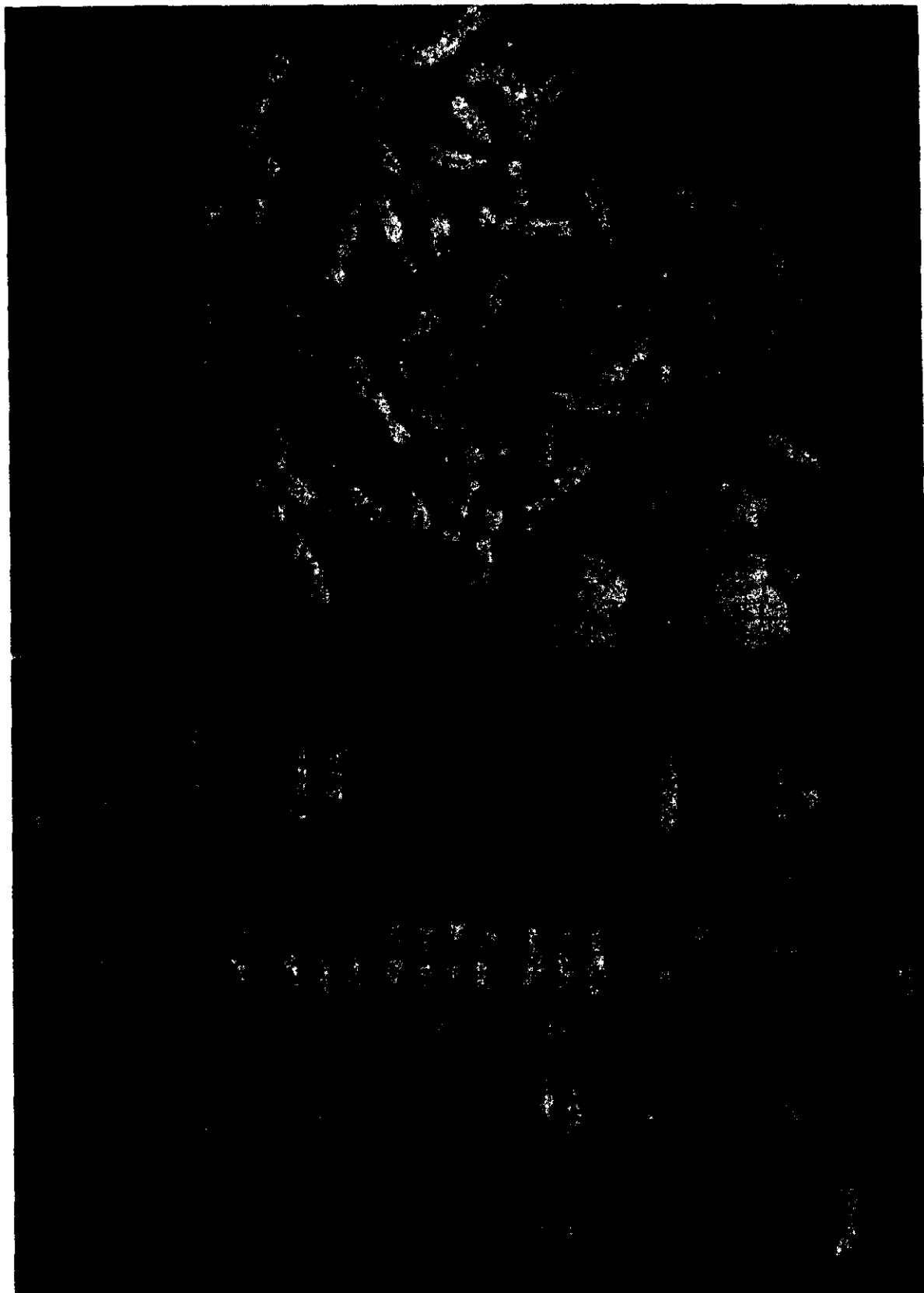


FIG. 3. - Piastra metafásica e cariotipo di cellule HC/SV40 con 50 cromosomi. Si notano riarrangiamenti multipli (bande QFQ) incluse trisomie 1p, 1q, 3p, 3q, 6, 7, 8, 10, 13, tetrasomia 9, monosomie 2, 4, 14, 15, 18, nullisomia 12, e assenza del cromosoma Y

BIBLIOGRAFIA

1. AARONSON, S. A. 1970. Susceptibility of human cell strains to transformation by simian virus 40 and simian virus 40 deoxyribonucleic acid. *J. Virol.* **6**: 470-475.
2. AARONSON, S. A. & TODARO, G. J. 1968. SV40 T antigen induction and transformation in human fibroblast cell strains. *Virology*. **36**: 254-261.
3. BLACK, P. H. 1968. The oncogenic DNA viruses. A review of *in vitro* transformation studies. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**: 391-426.
4. BOREK, C. 1980. X-ray-induced *in vitro* neoplastic transformation of human diploid cells. *Nature* (London). **283**: 776-778.
5. BROOKS, S. E., AMSTERDAM, D., HOFFMAN, L. M., ADACHI, M. & SCHNECK, L. 1979. Cytology growth characteristics and cellular alterations followings SV40-induced transformation of human foetalebrain cells derived from a G_{m2} gangliosidosis and control. *J. Cell. Sci.* **38**: 211-223.
6. CASPERSSON, T., LOMAKKA, G. & ZECK, L. 1971. The 24 fluorescent patterns of the human metaphase chromosomes: distinguishing characters and variability. *Hereditas*. **67**: 89-102.
7. GOTOH, S., GELB, L. & SCHLESSINGER, D. 1979. SV40-transformed human diploid cells that remain transformed throughout their limited lifespan. *J. Gen. Virol.* **42**: 409-414.
8. HAYFLICK, L. & MORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exper. Cell. Res.* **25**: 585-621.
9. HOGAN, M. J., ALVARADO, J. A. & WEDDELL, J. E. 1971. Choroid. In: *Histology of the human eye*. W. B. Saunders Co. Philadelphia, pp. 320-392.
10. JENSEN, F., KOPROWSKI, H. & PONTEN, J. A. 1963. Rapid transformation of human fibroblast cultures by simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **50**: 343-348.
11. KAKUNAGA, T. 1978. Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **75**: 1334-1338.
12. KOPROWSKI, H., PONTEN, J. A., JENSEN, F., RAVDIN, R. G., MOORHEAD, P. & SAKSELA, E. 1962. Transformation of cultures of human tissue infected with simian virus 40. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 281-292.
13. MACPHERSON, I. & MONTAGNIER, L. 1964. Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by Polyoma virus. *Virology*. **23**: 291-294.
14. MILO, G. E. JR. & DI PAOLO, J. A. 1978. Neoplastic transformation of human diploid cells *in vitro* after chemical carcinogen treatment. *Nature* (London). **275**: 130-132.
15. MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M. & HUNGERFORD, D. A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* **20**: 613-616.
16. POLANI, P. E. 1979. DNA repair defects and chromosome instability disorders. Human Genetics: possibilities and realities. Ciba Foundation Symposium 66. *Excerpta Med.* (Amsterdam). pp. 81-127.
17. POTTER, C. W., POTTER, A. M. & OXFORD, J. S. 1970. Comparison of transformation and T-antigen induction in human cell lines. *J. Virol.* **5**: 293-298.
18. REZNIKOFF, C. A. & DE MARS, R. 1981. *In vitro* chemical mutagenesis and viral transformation of a human endothelial cell strain. *Cancer Res.* **41**: 1114-1126.
19. RISSE, R. & POLLACK, R. 1974. A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse 3T3 cells. *Virology*. **59**: 477-489.
20. SANTOLI, D., WROBLEWSKA, Z., GILDEN, D. H., GIRARDI, A. & KOPROWSKI, H. 1975. Human brain tissue culture. III. PML-SV40-induced transformation of brain cells and establishment of permanent lines. *J. Comp. Neurol.* **161**: 317-328.
21. SHEIN, H. & ENDERS, J. 1962. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures: I. Morphology and growth characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. **48**: 1164-1172.
22. SHEIN, H. M. 1967. Transformation of astrocytes and destruction of spongioblast by simian tumor virus 40 (SV40) in cultures of human foetal neuroglia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **26**: 309-326.
23. SUMMER, A. T., EVANS, H. S. & BUCKLAND, R. A. 1971. A new technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.* **232**: 31-39.
24. TODARO, G. J., GREEN, H. & SWIFT, M. R. 1966. Susceptibility of human diploid fibroblast strains to transformation by SV40 virus. *Science*. **153**: 1252-1254.
25. TODARO, G. J. & MARTIN, G. M. 1967. Increased susceptibility of Down's syndrome fibroblasts to transformation by SV40 virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **124**: 1232-1236.
26. WOLMAN, S. R., STEINBERG, M. L. & DEFENDI, V. 1980. Simian virus 40-induced chromosome changes in human epidermal cultures. *Cancer Gen. and Cytogen.* **2**: 39-46.

Studio delle strutture recettoriali di cellule BHK 21 coinvolte nell'interazione con il virus della stomatite vescicolare

LUCILLA SEGANTI, PAOLA MASTROMARINO, FABIANA SUPERTI, ELENA GRIPPA, NICOLA ORSI

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - È stata eseguita una ricerca sulle cellule BHK 21, per identificare le strutture chimiche di membrana responsabili del legame con il virus della stomatite vescicolare (VSV). Lo studio è stato condotto inducendo alterazioni chimiche specifiche sulle membrane di monostrati cellulari, con differenti enzimi proteolitici e glicosidici. Parallelamente, è stato condotto uno studio anche sulle lipoproteine sieriche, inibitori non anticorpali dell'emagglutinazione del VSV. In particolare, le molecole lipoproteiche intere, le apolipoproteine e gli estratti lipidici sono stati saggiati per verificarne la competizione con i recettori cellulari nel legame con il virus.

Summary (BHK 21 Cell Receptor Structures Involved in the Interaction with Vesicular Stomatitis Virus). - A research has been carried out on BHK 21 cells to identify the membrane chemical structures involved in the linkage with vesicular stomatitis virus (VSV). This study was made inducing specific chemical alterations on cell monolayers, treated with different proteases and glycosidases. On the same, another study has been carried out on serum lipoproteins, non antibody inhibitors of VSV hemagglutination. In particular entire lipoproteins, apolipoproteins and lipidic extracts have been tested to verify their competition with cell receptors for virus attachment.

INTRODUZIONE.

Il virus della stomatite vescicolare (VSV) presenta sul suo involucro delle proiezioni glicoproteiche che permettono l'attaccamento del virus alle cellule sensibili e sono responsabili di entrambe le proprietà emagglutinante e infettante. La natura chimica di tali unità di ricognizione virale è ben nota [1], mentre i raggruppamenti molecolari recettoriali presenti sulla superficie delle cellule sensibili non sono stati ancora ben identificati. Alcune informazioni sulla struttura chimica dei recettori per il VSV sono state però ottenute alterando la superficie delle cellule, per mezzo di vari trattamenti chimici. È stato così osservato che dopo il trattamento di monostrati di cellule L con tripsina e neuraminidasi si ha un aumento dell'attaccamento del VSV [2] e che eritrociti di oca, trattati con questi stessi enzimi, appaiono più sensibili all'agglutinazione da parte dello stesso virus [3]. Per altri rhabdovirus

invece, come nel caso del virus rabbico, è stato visto come l'emagglutinazione resti invariata dopo il trattamento degli eritrociti sensibili con varie proteasi, periodato di potassio e neuraminidasi [4]. Per quanto concerne in particolare il ruolo delle molecole glicidiche presenti nei recettori, in una nostra precedente ricerca abbiamo dimostrato che alcuni esosomi presenti sulle superfici di emazie di oca partecipano al legame con il VSV [3].

In questo lavoro abbiamo cercato di chiarire la natura chimica dei siti recettoriali per il VSV: da una parte modificando a mezzo di enzimi specifici per proteine e carboidrati le membrane di cellule BHK 21 e osservando poi la differenza nell'interazione con il virus fra le cellule trattate e non trattate, e dall'altra studiando l'azione di inibitori lipoproteici sulla motiplicazione del VSV.

MATERIALI E METODI.

Virus. - Il VSV (sierotipo Indiana), è stato coltivato in cellule BHK 21/C13 preparate in MEM (Minimum Essential Medium) con sali di Eagle e siero di vitello al 7%. Il liquido colturale veniva raccolto 24 ore dopo l'infezione, quindi centrifugato a 3000 r.p.m. per 20 min e conservato a -20°C .

Trattamenti enzimatici delle cellule BHK 21. - I trattamenti erano eseguiti su monostrati confluenti di cellule BHK 21 lavate in PBS per allontanare tracce di siero. Dopo i trattamenti, i soprannatanti cellulari venivano testati per verificare il rilascio di proteine, acido sialico e zuccheri neutri con le metodiche rispettivamente di Lowry et al. [5], Aminoff [6], Dubois et al. [7]. I monostrati venivano nuovamente lavati tre volte e si procedeva all'infezione con 100 TCD₅₀ di VSV. Dopo 1 ora l'eccesso di virus veniva allontanato e si aggiungeva MEM senza siero.

Trattamenti con proteasi. - Sono state usate tripsina (0,1 mg/ml), α -chymotripsina (0,01 mg/ml), pronasi (1 $\mu\text{g/ml}$) e papaina (1 $\mu\text{g/ml}$). I monostrati venivano trattati con gli enzimi proteolitici per 15 min a 25°C .

Trattamenti con glicosidasi. - Sono state usate la neuraminidasi (1 $\mu\text{g/ml}$), l' α -mannosidasi (25 $\mu\text{g/ml}$), la β -galattosidasi (65 $\mu\text{g/ml}$) e l' α -fucosidasi (6 $\mu\text{g/ml}$). Gli enzimi venivano fatti agire sui monostrati per 15 min a 37° C.

Reazione di emagglutinazione (HA). - La produzione di virus emagglutinante veniva verificata diluendo per raddoppio i sopranatanti delle cellule infettate in micropiastre usando come diluente BABS (Borate Albumine Buffer Saline) a pH 9 ed emazie di oca allo 0,25 % secondo la metodica descritta da Halonen et al. [8]. Il titolo HA era espresso come reciproco della più alta diluizione del virus che causava il 50 % di emagglutinazione.

Separazione dal siero umano delle frazioni lipoproteiche. - Da un pool di sieri umani normali, venivano separate per flottazione all'ultracentrifuga Spinco modello L2 65B, le VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins), HDL (High Density Lipoproteins), alle densità finali del siero di 1,019 gr/ml, 1,063 gr/ml, 1,210 gr/ml secondo la metodica di Havel et al. [9]. Successivamente le classi lipoproteiche flotate venivano separate nei rispettivi componenti apolipoproteici e lipidici, come precedentemente descritto [10]. Queste frazioni venivano analizzate per il loro contenuto in proteine e lipidi, saggiate per la loro attività emagglutino-inibente (HI) e la loro attività inibente la moltiplicazione virale.

Prove di emagglutino-inibizione (HI) e di inibizione della produzione di virus emagglutinante in cellule BHK 21. - Le prove di HI venivano eseguite a +4° C in micropiastre secondo la metodica di Halonen et al. [11], con un tempo di contatto tra virus e inibitori di 12 ore. Le prove di inibizione della moltiplicazione del VSV venivano eseguite incubando volumi uguali di virus contenente 100 TCD₅₀ con inibitori a varie concentrazioni per 60 min a 37° C e 8 ore a +4° C, e successivamente infettando con la miscela virus-inibitori i monostrati. Si verificava quindi a vari intervalli di tempo dopo l'infezione la produzione di virus emagglutinante nei sopranatanti.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Una prima serie di esperimenti è stata condotta trattando monostrati di cellule BHK 21 con le seguenti proteasi: tripsina, α -chimotripsina, papaina e pronasi. Dopo aver esplicitato la loro azione, gli enzimi erano allontanati mediante lavaggio in PBS dei monostrati, i quali venivano infettati con 100 TCD₅₀ di VSV. Nella Fig. 1 sono riportati i dati riguardanti la moltiplicazione del VSV in cellule BHK 21 trattate con queste diverse proteasi. Tra queste solo la tripsina ha determinato un aumento della produzione di virus emagglutinante, mentre le altre non hanno causato variazioni rispetto ai controlli. È evidente quindi che l'azione delle varie proteasi, pur determinando il distacco di glicoproteine e glicopeptidi di superficie dalle cellule BHK 21, non inattiva i recettori. Quanto all'aumento della resa virale osservato dopo il trattamento con tripsina, esso

è evidentemente da riportare ad un maggior attacco del virus, che può essere dovuto sia allo smascheramento dei recettori virali, sia alla perdita di componenti di superficie con conseguente addensamento di strutture idrofobiche in *patches* che facilita il fenomeno dell'attacco.

Successivamente sono state condotte delle prove trattando le cellule BHK 21 con neuraminidasi (RDE). Dopo l'allontanamento dell'enzima i vari monostrati cellulari venivano trattati con α -mannosidasi oppure con β -galattosidasi o con α -fucosidasi. Nella Fig. 2 si osserva la produzione di VSV in cellule BHK 21 trattate con neuraminidasi e successivamente con le altre glicosidasi. I dati dimostrano come la rimozione dell'acido sialico dalle superfici cellulari aumenti la capacità delle cellule BHK 21 di legarsi al virus, probabilmente a seguito di una diminuzione delle forze elettrostatiche repulsive tra virus e cellule ospiti, come già osservato per il VSV in cellule L [2] e per alcuni adenovirus in cellule KB [11]. La successiva rimozione degli zuccheri dalla superficie delle cellule pretrattate con neuraminidasi, inibisce la produzione di virus emagglutinante. Nella Fig. 3 sono riportati i dati riguardanti la produzione di virus emagglutinante in cellule BHK 21 trattate con tripsina e successivamente con le glicosidasi. Si può così osservare che l'allontanamento del mannosio, del galattosio e del fucosio dalle superfici cellulari

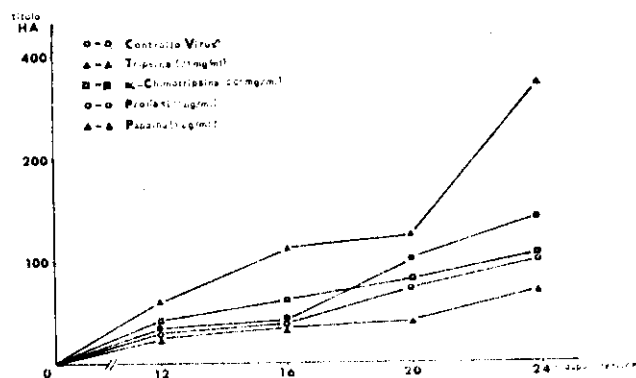


FIG. 1. - Produzione di virus emagglutinante in cellule BHK 21 trattate, prima dell'infezione con VSV, con proteasi

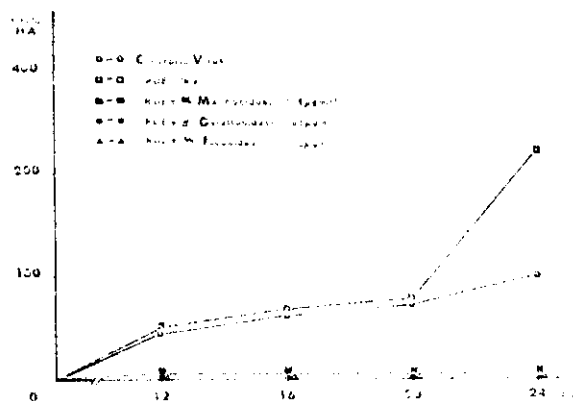


FIG. 2. - Produzione di virus emagglutinante in cellule BHK 21 trattate con neuraminidasi (RDE) e successivamente con α -mannosidasi, β -galattosidasi e α -fucosidasi prima dell'infezione con VSV

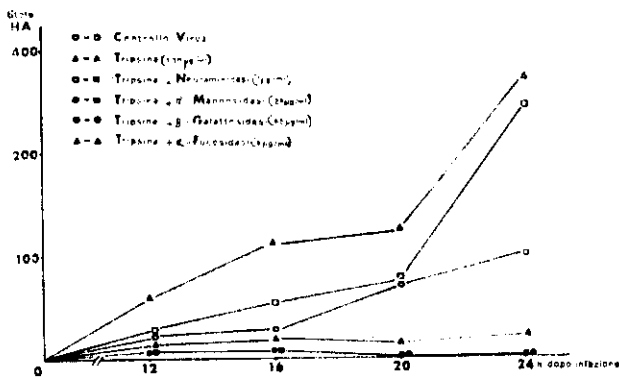


FIG. 3. - Produzione di virus emagglutinante in cellule BHK 21 trattate con tripsina e successivamente con glicosidasi prima dell'infezione con VSV

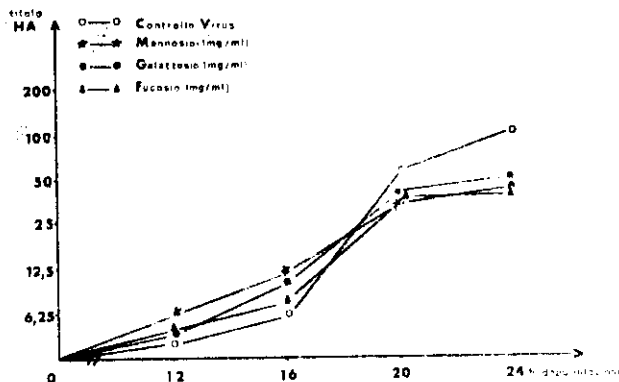


FIG. 4. - Produzione di emagglutinina virale in cellule BHK 21 infettate con VSV pre-incubato con mannosio, galattosio e fucosio

pretrattate con tripsina, riduce fortemente la produzione di virus emagglutinante, mentre la rimozione dell'acido sialico non determina variazioni significative. A questo punto abbiamo ritenuto indispensabile verificare se questi stessi carboidrati saggiati separatamente e preincubati con il virus a 37° C per 1h e a 4° C per 8h, fossero capaci di inibire la moltiplicazione del VSV.

Mentre per altri virus, ad esempio per alcuni flavivirus [12] e per alcuni enterovirus [13], è stata osservata un'azione inibente ad opera di alcuni esosi e disaccaridi, nessuno tra gli esosi da noi saggiati si è dimostrato capace di modificare, rispetto ai controlli, la moltiplicazione del VSV. Poiché i precedenti risultati da noi ottenuti inducono a ritenere che il mannosio, il galattosio e il fucosio siano presenti nei siti recettoriali e interagiscano con il VSV, è legittimo avanzare l'ipotesi che questi zuccheri siano legati ad una struttura *carrier* indispensabile per la loro azione. I risultati ottenuti con le varie proteasi fanno supporre che i componenti proteici tripsino-sensibili non siano direttamente coinvolti nel legame con il virus. Siamo perciò stati indotti a ritenere possibile la partecipazione di un *carrier* di natura lipidica. Una simile ipotesi appare suffragata da quanto già osservato per altri virus; per esempio il virus della rosolia è capace di legarsi ad un glicolipide contenente galattosammina [14], al-

cuni gangliosidi sembrano fungere da recettori per il virus Sendai [15] e alcuni liposomi si legano specificatamente al virus Sindbis [16], al VSV, al virus della foresta del Semliki e al virus influenzale [17]. Per verificare questa ipotesi nei confronti del VSV, abbiamo condotto uno studio sulle lipoproteine sieriche umane che inibiscono l'emagglutinazione del virus. A questo scopo abbiamo separato da un pool di sieri umani le varie classi di lipoproteine, VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), LDL (*Low Density Lipoproteins*), HDL (*High Density Lipoproteins*), che flottano all'ultracentrifuga alle densità finali rispettivamente di 1.019, 1.063, 1.210 e le abbiamo separate nei rispettivi componenti lipidici e apolipoproteici. Tutte queste classi di lipoproteine sono in grado di inibire in varia misura l'emagglutinazione del virus e tale attività non è legata alla parte proteica (apolipoproteina), ma quasi esclusivamente ai componenti lipidici.

Ci siamo serviti nei nostri esperimenti delle LDL perché mostravano la maggiore attività emagglutinoinibente ed abbiamo allestito con queste preparazioni e con i relativi lipidi estratti da esse delle prove di inibizione della crescita virale. Nelle Fig. 5 e 6 sono illustrati i dati relativi all'attività inibente la moltiplicazione del VSV, svolta rispettivamente dalle LDL e dagli estratti lipidici pre-incubati con il virus prima di infettare i monostati. Dai dati riportati emerge come la produzione di virus emagglutinante in cellule BHK 21

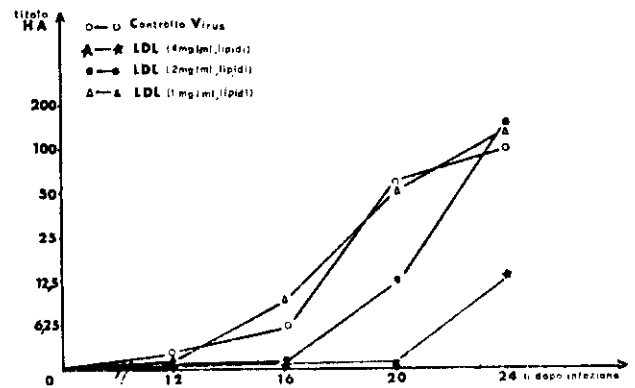


FIG. 5. - Produzione di emagglutinina virale in cellule BHK 21 infettate con VSV pre-incubato con LDL (Low Density Lipoproteins)

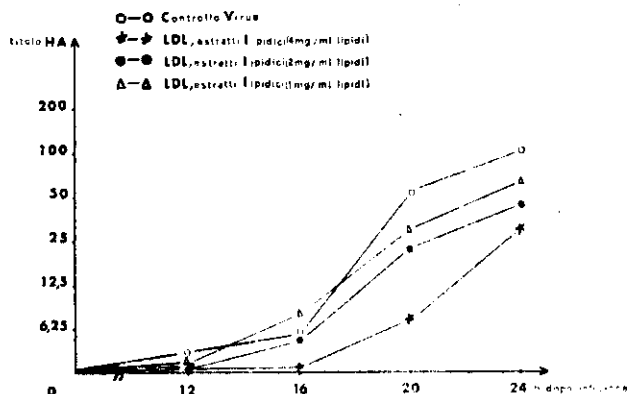


FIG. 6. - Produzione di emagglutinina virale in cellule BHK 21 infettate con VSV pre-incubato con estratti lipidici da LDL

sia inibita alle concentrazioni in lipidi di 4 mg/ml, sia per le LDL che per i lipidi estratti, ma non a concentrazioni inferiori. Questi dati da noi ottenuti con gli inibitori sierici non anticorpali sono in accordo con l'ipotesi avanzata circa l'esistenza di un *carrier* lipidico per i carboidrati nel legame con il VSV.

Occorre però dire che il fatto che l'inibizione del virus avvenga solo ad elevate concentrazioni di lipidi, può far pensare sia ad un legame specifico sia ad una interazione della membrana dei virioni con le lipoproteine. Questa interazione potrebbe determinare, secondo quanto osservato recentemente [18], una estrazione del

colesterolo dalla membrana del VSV, con conseguente alterazione nella distribuzione laterale delle glicoproteine e quindi una diminuzione dell'infettività.

Da questo studio indiretto condotto sulle lipoproteine sieriche non è, quindi, possibile affermare definitivamente la partecipazione dei lipidi quali strutture *carrier* per i carboidrati nelle molecole recettoriali delle cellule BHK 21 per il VSV, ed occorreranno in merito certamente vari altri tipi di indagine. Riteniamo comunque importante intraprendere vie diverse per tentare di chiarire l'identità chimica delle strutture cellulari coinvolte nell'interazione virus-cellula.

BIBLIOGRAFIA

1. KINGSFORD, L., EMERSON, S. U. & KELLEY, J. M. 1980. Separation of cyanogen bromide cleaved peptides of the vesicular stomatitis virus glycoprotein and analysis of their carbohydrate content. *J. Virol.* **36**: 309-316.
2. SCHLOEMER, R. H. & WAGNER, R. R. 1975. Cellular adsorption function of the sialoglycoprotein of vesicular stomatitis virus and its neuraminic acid. *J. Virol.* **15**: 882-893.
3. SUPERTI, F., CONTI, C., MASTROMARINO, P., SINIBALDI, L. & SEGANTI, L. 1981. Ruolo dei carboidrati nell'interazione tra il virus della stomatite vescicolare e gli eritrociti di oca. *Atti Convegno T.U.E.M.A. Soc. It. Microbiol.* Siena, 29-30 Maggio.
4. KUWERT, E., WIKTOR, T. J., SOKOL, F. & KOPROWSKI, H. 1968. Hemagglutination by rabies virus. *J. Virol.* **2**: 1381-1392.
5. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, W. O., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
6. AMINOFF, D. 1959. The determination of free sialic acid in the presence of the bound compound. *Virol.* **7**: 355-357.
7. DUBOIS, M., GILES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
8. HALONEN, P. E., TOIVANEN, P. & NIKKARI, T. 1974. Non specific serum inhibitors of activity of haemagglutinins of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J. Gen. Virol.* **22**: 309-318.
9. HAVEL, R. J., EDER, H. A. & BRAGDON, J. H. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1353.
10. MASTROMARINO, P., SEGANTI, L. & ORSI, N. 1980. Relationship between enzymatic modifications of serum low density lipoproteins and their haemagglutination inhibiting activity towards Sindbis virus. *Archiv. Virol.* **65**: 37-44.
11. BOULANGER, P. A., HOUDRET, N., SCHARFMAN, A. & LEMAY, P. 1972. The role of surface sialic acid in adenovirus cell-adsorption. *J. Gen. Virol.* **16**: 429-434.
12. NOZIMA, T., YASUI, K. & HOMMA, R. 1968. Reaction of several saccharides with japanese encephalitis virus. *Acta Virol.* **12**: 296-300.
13. LERNER, A. M., BAILEY, E. J. & TILLOTSON, J. R. 1966. Enterovirus hemagglutination: inhibition by several enzymes and sugars. *J. Immunol.* **95**: 1111-1115.
14. SHORTRIDGE, K. F., BIDDLE, F. & PEPPER, D. S. 1972. Rubella virus nonspecific haemagglutination inhibitor: evidence for the role of glycolipid bound to low density (β) lipoprotein. *Clin. Chim. Acta.* **42**: 285-294.
15. HAYWOOD, A. M. 1974. Characteristics of Sendai virus receptors in a model membrane. *J. Mol. Biol.* **83**: 427-436.
16. MOONEY, J. J., DARLYMPLE, J. M., ALVING, C. R. & RUSSEL, P. K. 1975. Interaction of Sindbis virus with liposoma model membranes. *J. Virol.* **15**: 225-231.
17. WHITE, J., MATLIN, K. & HELENUS, A. 1981. Cell fusion by Semliki forest, influenza and vesicular stomatitis viruses. *J. Cell Biol.* **89**: 674-679.
18. PAL, R., BARENHOLZ, Y. & WAGNER, R. R. 1981. Depletion and exchange of cholesterol from the membrane of vesicular stomatitis virus by interaction with serum lipoproteins or poly (vinylpyrrolidone) complexed with bovine serum albumin. *Biochem.* **20**: 530-539.

Studio del movimento anticorpale verso i virus BK, Herpes e Cytomegalovirus in trapianti renali

LAURA SINIBALDI, CARLO MANCINI, DANIELA RIVANERA e PAOLA GOLDONI

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - È stato eseguito uno studio del movimento anticorpale verso alcuni virus in individui sottoposti a trapianto renale mediante il saggio del titolo anticorpale prima del trapianto e successivamente all'intervento. In particolare gli anticorpi verso il virus BK sono stati titolati mediante reazione di emagglutinazione-inibizione, mentre quelli verso Herpes simplex 1, Herpes varicella zoster e Cytomegalovirus sono stati determinati con la reazione di fissazione del complemento. I risultati ottenuti sono stati analizzati tenendo conto dei trattamenti terapeutici ai quali i pazienti venivano sottoposti e ad eventuali fenomeni di rigetto presentati.

Summary (Antibodies against BK, Herpes and Cytomegaloviruses in Kidney-transplanted Patients). - A study on modulation of antibody levels against some viruses has been carried out in patients subjected to kidney transplant by means of antibody titrations before and after surgery. In particular the antibodies against BK virus were titrated by means of hemagglutination-inhibition, while those against Herpes simplex 1, Herpes zoster and Cytomegalovirus were titrated by complement fixation.

The results obtained were analyzed taking into account the therapeutic treatments to which patients had been subjected and the eventual phenomena of rejection.

INTRODUZIONE.

È noto ormai da tempo che l'infezione da virus BK, isolato per la prima volta dalla Gardner nel 1971 [1] da un individuo sottoposto a trapianto renale, insorge generalmente nella prima infanzia. Ciò è dimostrato da tutta una serie di indagini epidemiologiche condotte per svelare la presenza di anticorpi verso il virus BK in campioni di popolazioni di varia età. È stato così visto ad esempio che in Inghilterra [2] la percentuale di positività era del 73 % in bambini compresi in età di 4-6 anni, mentre in Finlandia [3] era del 63 % in bambini compresi in età di 2-10 anni ed infine in Italia [4] del 62,2 % per età compresa tra 3-5 anni. Sempre nel nostro paese, ed in particolare a Roma, è stato visto che in un campione di popolazione rappresentato da 482 sieri, prelevati da soggetti normali di ambo i sessi e di varia età, la sieropositività era del 65,2 % [5]. Si ritiene che dopo l'infezione primaria il virus BK possa rimanere latente e riattivarsi

sovente negli ospiti immunocompromessi. Fra questi sono da annoverare gli individui che vengono sottoposti ad un trapianto d'organo ed ai quali prima e dopo l'intervento viene praticata una serie di terapie intese ad impedire il rigetto dell'organo, ma che d'altra parte favoriscono l'insorgenza o la riattivazione di infezioni ad eziologia prevalentemente virale. Nell'ultimo decennio, Gardner e Coll. hanno osservato che l'incidenza di aumento di anticorpi antipolioma virus in soggetti trapiantati o comunque immunocompromessi era di circa il 50 %, senza però che fosse possibile associare con certezza nessuna forma clinica a questo tipo di infezione. Le uniche manifestazioni osservate in concomitanza al rialzo anticorpale erano delle cistiti e delle stenosi uretrali, giudicate però di incerta significatività [6].

Scopo del nostro lavoro è stato quello di vedere se in un gruppo di individui sottoposti a trapianto renale e seguiti durante tutto il periodo della degenza ospedaliera fosse possibile mettere in evidenza un'eventuale infezione primaria da virus BK od una riattivazione di un'infezione latente e persistente. Questa indagine è stata eseguita in parallelo con la determinazione dei titoli anticorpali verso il virus *Herpes simplex* 1, *Herpes varicella zoster* e i *Cytomegalovirus* al fine di avere un quadro, il più possibile completo, sulla situazione immunitaria di questi pazienti nei confronti di determinati agenti virali [7].

MATERIALI E METODI.

Sieri umani. - Sono stati saggiati 40 sieri di pazienti sottoposti a trapianto renale. Di questi 40 casi solo 24 sono stati seguiti nel tempo con prelievi e seguiti settimanalmente.

Trattamento dei sieri con periodato di potassio. - 50 µl di una soluzione di KIO₄ venivano aggiunti a 50 µl di siero. Dopo 1 ora di contatto a temperatura ambiente venivano aggiunti 50 µl di una soluzione di glucosio al 20 %.

Antigene emagglutinante. - L'antigene era ottenuto mediante coltivazione del virus BK su cellule Vero cresciute in terreno 199 con sali di Earle's e con aggiunta di siero bovino al 10 %. Lo stesso terreno veniva ado-

perato per il mantenimento delle cellule senza alcuna aggiunta di siero. Il virus veniva inoculato su monostato completo e dopo 90 min di contatto tra virus e cellule veniva aggiunto terreno senza siero. Dopo 7 giorni i liquidi di coltura venivano raccolti e centrifugati a 3.000 giri per 15 min per rimuovere i detriti cellulari. Il sopranatante veniva saggiato per l'attività emagglutinante.

Reazione di emagglutinazione e di inibizione dell'emagglutinazione. - La reazione di emagglutinazione era eseguita a $+4^{\circ}\text{C}$ in micropiastre di plastica allestendo una doppia serie di diluizioni in tampone HSA (Hepes-Saline-Albumin, pH 7,2) e aggiungendo ad ogni diluizione 50 μl di emazie umane di gruppo 0 allo 0,2% in tampone HSA (diluizione fino all'8% in PBS, Phosphate Buffer Saline, ed ulteriore diluizione fino allo 0,2% in tampone HSA). Dopo l'aggiunta delle emazie le piastre venivano tenute a $+4^{\circ}\text{C}$ per 90 min ed il titolo HA era determinato in base alla più alta diluizione capace di dare emagglutinazione completa. Per la reazione di emagglutinazione-inibizione, al fine di assicurare la maggiore accuratezza possibile, nella diluizione dei sieri venivano usate micropipette tarate Gilson, con le quali da 25 μl di siero si preparavano diluizioni per raddoppio in tampone HSA. Ad ogni diluizione venivano aggiunti 25 μl di virus contenente 4 dosi emagglutinantanti e dopo una notte di contatto a $+4^{\circ}\text{C}$ venivano aggiunti 50 μl di emazie umane di gruppo 0 allo 0,2% in tampone HSA. I risultati erano letti dopo 90 min e il titolo HI era espresso come il reciproco della più alta diluizione capace di inibire completamente l'emagglutinazione.

Reazione di fissazione del complemento. - La reazione di fissazione del complemento è stata eseguita con il

micrometodo a gocce su piastre perper. I sieri prima della reazione venivano inattivati a 56°C per 30 min, quindi venivano effettuate diluizioni per raddoppio in tampone Veronal (dietilbarbiturato, pH 7,3), a cui venivano aggiunte 2 unità finali di antigene e 2 unità finali di complemento. Dopo 18 ore a $+4^{\circ}\text{C}$, alla miscela siero-antigene-complemento veniva aggiunto il sistema emolitico. La lettura veniva eseguita dopo 60 min di incubazione a 37°C . La positività viene data alla diluizione del siero in cui l'emolisi è inibita fino al 70%.

RISULTATI E CONCLUSIONI.

Sono stati in totale studiati 40 casi, rappresentati da pazienti sottoposti a trapianti renali tra il gennaio ed il settembre 1981. Di questi casi però soltanto 24 sono stati seguiti per un numero sufficiente di determinazioni, perché gli altri 16 casi non hanno consentito una regolare indagine. I risultati finora ottenuti vengono perciò riferiti soltanto ad un totale di 24 casi. Ad ognuno di questi individui veniva fatto un prelievo di siero al momento del trapianto e poi i prelievi successivi praticati settimanalmente fino al momento in cui l'individuo veniva dimesso. Questi sieri venivano titolati, dopo essere stati pretrattati con KIO_4 al fine di eliminare gli inibitori non anticorpali eventualmente presenti [8], con la reazione di emagglutinazione-inibizione per il virus BK. Le titolazioni degli anticorpi verso il virus *H. simplex* 1, *H. varicella zoster* e *Cytomegalovirus* venivano eseguite mediante la fissazione del complemento.

I risultati ottenuti dalle titolazioni degli anticorpi verso il virus BK sono riportati nella Tab. 1. Da questa appare evidente come nella maggioranza dei casi fosse

Tabella 1. - Titolo emagglutinino-inibente verso il virus BK in sieri di trapiantati renali.

N. CASI	al trapianto	1 ^a settimana	2 ^a settimana	3 ^a settimana	4 ^a settimana	5 ^a settimana	6 ^a settimana	7 ^a settimana	8 ^a settimana	9 ^a settimana	10 ^a settimana	11 ^a settimana
1 ...	---	---	---	---	---	---	---	---	48	---	48	---
2 ...	---	---	---	---	---	48	96	---	96	---	---	---
3 ...	---	---	---	---	48	48	---	48	384	---	---	---
7 ...	72	---	24	---	---	---	---	---	---	---	---	---
12 ...	---	---	---	---	192	---	96	192	---	---	---	---
13 ...	96	---	96	96	192	384	---	---	---	---	---	---
15 ...	24	---	48	48	96	96	24	12	---	---	---	---
17 ...	24	---	0	12	48	12	---	---	---	---	---	---
18 ...	---	---	6	---	12	---	---	---	---	---	---	---
19 ...	24	24	---	---	96	---	48	48	---	---	---	---
22 ...	12	12	24	12	---	---	---	---	---	---	---	---
23 ...	192	192	96	---	---	---	96	---	---	---	96	96
25 ...	0	---	0	24	3	---	0	---	---	---	---	---
26 ...	12	---	48	---	24	---	12	---	---	---	---	---
27 ...	0	24	48	12	48	---	---	---	---	---	---	---
31 ...	12	24	---	6	24	24	48	96	192	192	96	48
32 ...	256	---	---	256	12	---	96	96	---	---	96	---
33 ...	0	48	48	6	6	48	48	24	---	---	---	---
34 ...	0	12	0	6	6	12	---	---	---	---	---	---
36 ...	96	12	---	---	24	---	24	48	---	24	---	---
37 ...	96	---	---	---	---	96	48	---	---	---	48	---
38 ...	0	24	192	192	192	192	192	192	192	---	---	---
39 ...	24	---	48	48	48	48	---	24	---	---	---	---
40 ...	12	364	364	364	364	192	---	---	---	---	---	---

già presente al momento del trapianto un titolo anticorpale emagglutinino-inibente con valori compresi tra 6 e 384, mentre in circa 1/5 dei sieri non era rilevabile alcun titolo anticorpale verso il virus BK. È possibile inoltre rilevare che fra i 24 casi presi in considerazione soltanto 4 hanno presentato un aumento significativo del titolo nel corso dell'osservazione. Prima di valutare l'importanza di questo aumento occorre però fare alcune considerazioni sulla particolare casistica studiata. Essa in effetti è costituita da pazienti che in alcuni casi già prima dell'intervento erano sottoposti a trattamenti immunodepressivi, ragion per cui il nostro primo prelievo, effettuato all'atto dell'intervento operatorio, poteva non corrispondere all'inizio del trattamento immunodepressivo, ma veniva soltanto a distanza di uno-due mesi dall'inizio di esso. Inoltre dopo il trapianto i pazienti potevano essere sottoposti a ripetute trasfusioni, suscettibili di modificare il titolo anticorpale del ricevente, almeno temporaneamente. Infine, in alcuni pazienti potevano verificarsi delle crisi di rigetto con conseguente modificazione del quadro immunitario, modificazione legata non soltanto all'immunità di tipo cellulare, ma anche a quella di tipo umorale.

In considerazione di tutti questi fattori, appare di notevole interesse il considerare negli stessi individui l'andamento dei titoli anticorpali verso i virus *H. simplex* 1, *H. varicella zoster* e *Cytomegalovirus*, come è riportato nelle Tab. 2, 3 e 4.

Dall'esame comparativo di queste tabelle, risulta che per i 4 sieri (sieri n. 3, 13, 38, 40) non è stato messo in evidenza contemporaneamente un aumento di titolo verso gli altri virus. Per meglio evidenziare questo fatto, nella Fig. 1 vengono riportati i titoli di ciascuno di questi quattro sieri nei confronti dei 4 virus saggiati.

Così appare evidente come il movimento anticorpale si sia verificato verso il solo virus BK e pertanto è da ritenere che esso sia da attribuire in effetti ad un'infezione primaria da questo virus o ad una riattivazione di un virus persistente. D'altra parte, la contro-prova di questa specificità nell'aumento del titolo verso un solo determinato virus può essere offerta dai sieri n. 15 e 33 (Fig. 2), in cui non si è avuta alcuna modificazione del titolo anticorpale verso il virus BK, verso l'*H. simplex* 1, l'*H. varicella zoster*, mentre si è avuto un significativo aumento nei confronti dei *Cytomegalovirus*.

Tabella 2. - Titolo anticorpale verso il virus *H. simplex* 1 mediante il test di fissazione del complemento in sieri di trapiantati renali.

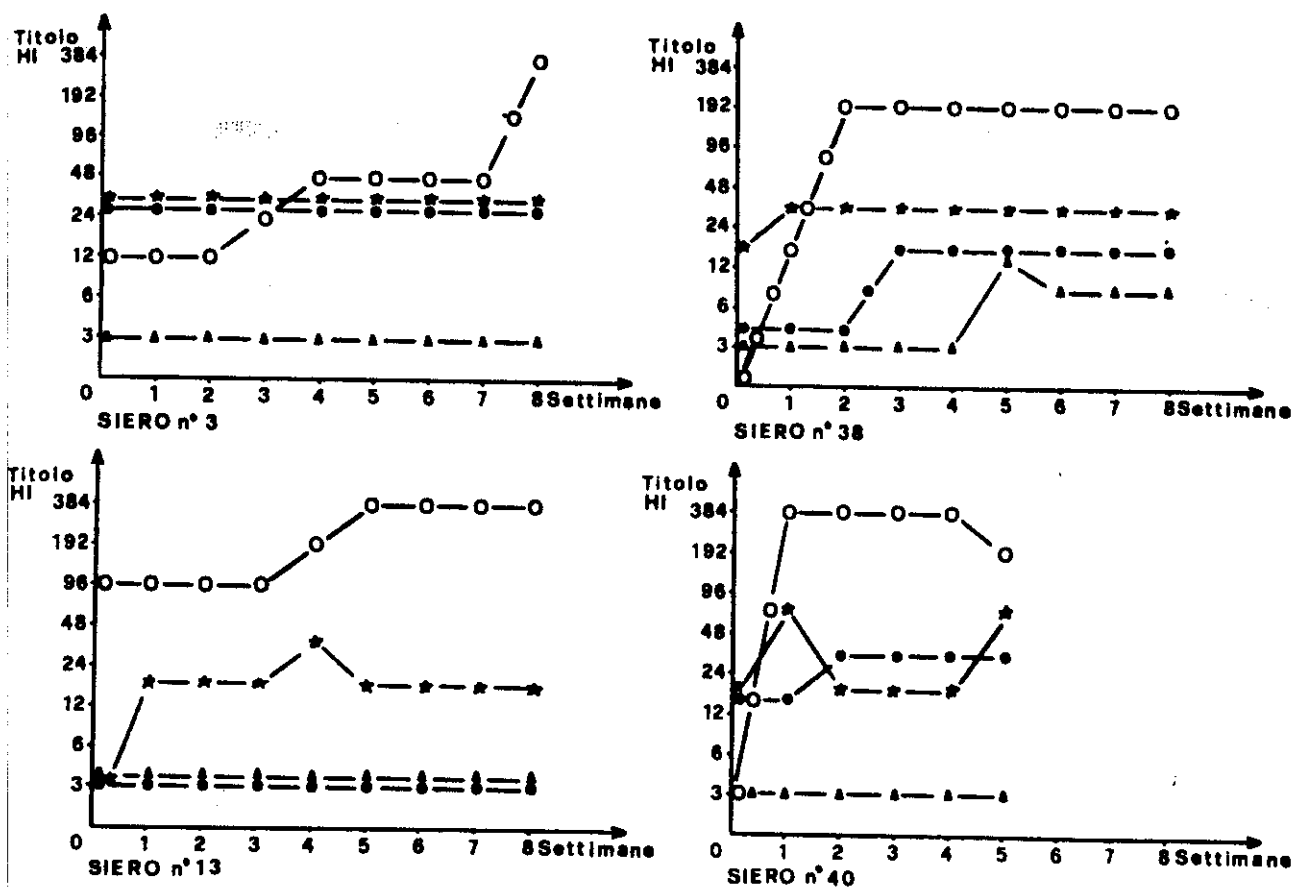
N. CASI	al trapianto	1 ^a settimana	2 ^a settimana	3 ^a settimana	4 ^a settimana	5 ^a settimana	6 ^a settimana	7 ^a settimana	8 ^a settimana	9 ^a settimana	10 ^a settimana
1	—	—	—	—	—	4	4	4	4	—	—
2	—	—	—	—	—	4	4	4	4	—	—
3	—	—	—	—	—	32	32	—	32	32	—
7	4	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—
12	.. 4	.. 4	8	16	—	—	—	—	—	—	—
13	.. 4	16	16	32	16	—	—	—	—	—	—
15	16	16	16	8	8	8	—	—	—	—	—
17	4	—	4	4	4	4	—	—	—	—	—
18	—	—	.. 4	—	4	—	—	—	—	—	—
19	16	8	—	—	4	0	0	—	—	—	—
22	4	4	4	4	—	—	—	—	—	—	—
23	16	32	16	—	—	—	16	—	—	—	—
25	.. 4	—	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—
26	4	4	.. 4	—	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—
27	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—	—
31	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—
32	.. 4	.. 4	32	32	32	64	16	32	—	—	—
33	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	16	16	16	16	—	—	—
34	16	32	32	32	32	32	—	—	—	—	—
36	16	16	32	32	32	32	32	—	—	—	—
37	32	32	32	32	.. 4	4	16	16	4	—	—
38	4	4	4	32	32	32	32	32	32	—	—
39	.. 4	.. 4	.. 4	16	16	16	16	.. 4	—	—	—
40	16	16	32	32	32	32	—	—	—	—	—

Tabella 3. — *Titolo anticorpale verso il virus H. varicella zoster mediante il test di fissazione del complemento in sieri di trapiantati renali.*

N. CASI	al trapianto	1 ^a settimana	2 ^a settimana	3 ^a settimana	4 ^a settimana	5 ^a settimana	6 ^a settimana	7 ^a settimana	8 ^a settimana	9 ^a settimana	10 ^a settimana
1	—	—	—	—	.. 4	4	4	4	4	4	4
2	—	—	—	—	.. 4	4	4	4	4	4	4
7	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—
12	4	4	4	4	4	—	—	—	—	—	—
13	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—	—
15	4	8	8	8	8	8	8	—	—	—	—
17	.. 4	.. 4	4	4	4	8	—	—	—	—	—
18	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—	—
19	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—
22	4	4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—	—
23	8	8	8	—	—	—	—	—	—	—	—
25	.. 4	.. 4	.. 4	4	8	8	—	—	—	—	—
26	.. 4	4	4	4	4	4	4	—	—	—	—
27	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	8	—	—	—	—	—	—
31	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—
32	32	32	32	32	32	32	32	—	—	—	—
33	16	16	16	4	4	—	—	—	—	—	—
34	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—	—
36	32	32	32	32	32	32	32	—	—	—	—
37	16	16	8	4	4	4	4	4	4	—	—
38	4	4	4	4	4	16	8	8	8	—	—
39	4	4	4	8	8	8	—	—	—	—	—
40	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	.. 4	—	—	—	—	—	—

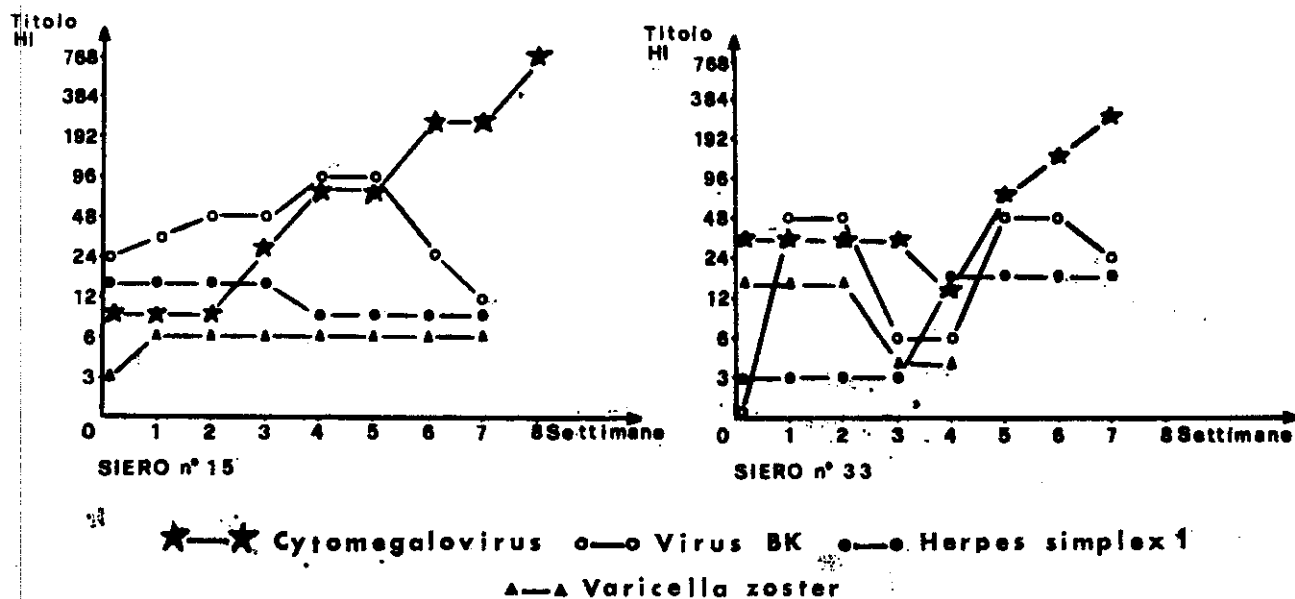
Tabella 4. — *Titolo anticorpale verso i Cytomegalovirus mediante il test di fissazione del complemento in trapiantati renali.*

N. CASI	al trapianto	1 ^a settimana	2 ^a settimana	3 ^a settimana	4 ^a settimana	5 ^a settimana	6 ^a settimana	7 ^a settimana	8 ^a settimana	9 ^a settimana	10 ^a settimana
1	—	—	—	—	—	—	—	—	32	—	32
2	—	—	—	—	—	—	—	—	32	—	—
3	—	—	—	—	32	32	—	32	32	—	—
7	16	32	—	32	—	—	—	—	—	—	—
12	32	128	256	—	—	—	—	—	—	—	—
13	.. 4	—	16	16	32	16	—	—	—	—	—
15	.. 4	—	8	8	64	64	256	256	—	—	—
17	.. 4	—	.. 4	32	16	32	—	—	—	—	—
18	—	—	.. 4	—	.. 4	—	—	—	—	—	—
19	64	64	—	—	16	64	32	—	—	—	—
22	256	256	32	32	—	—	—	—	—	—	—
23	64	64	32	—	—	—	128	—	—	—	—
25	8	—	16	4	4	8	—	—	—	—	—
26	32	—	32	—	32	—	32	—	—	—	—
27	32	32	4	—	32	—	—	—	—	—	—
31	.. 4	.. 4	8	8	8	4	8	—	—	—	—
32	16	32	32	32	32	32	8	16	—	—	—
33	32	32	32	32	16	64	128	256	—	—	—
34	32	64	64	32	32	32	—	—	—	—	—
36	4	16	32	16	16	8	8	—	—	—	—
37	64	64	16	16	8	4	8	4	4	—	—
38	16	32	32	32	32	32	32	32	32	—	—
39	32	32	32	32	32	16	16	16	—	—	—
40	16	64	16	16	16	64	—	—	—	—	—



★—★ Cytomegalovirus ○—○ Virus BK ●—● Herpes simplex 1
 ▲—▲ Varicella zoster

Fig. 1. - Andamento dei livelli anticorpali nei 4 sieri di pazienti che hanno mostrato aumento del titolo emagglutino-inibente verso il virus BK



★—★ Cytomegalovirus ○—○ Virus BK ●—● Herpes simplex 1
 ▲—▲ Varicella zoster

Fig. 2. - Andamento dei livelli anticorpali nei 2 sieri di pazienti che hanno mostrato un aumento del titolo fissante il complemento verso i Cytomegalovirus

BIBLIOGRAFIA

1. GARDNER, S. D. & FIELD, A. M. 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet*. **1**.
2. GARDNER, S. D. 1973. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.K.). *Br. Med. J.* **1**: 77-78.
3. MANTYJARVI, R. A., MEURMAN, O. H., VIHMA, L. & BERGLUND, B. 1973. A human papovavirus (B.K.), biological properties and seroepidemiology. *Ann. Clin. Res.* **5**: 283-287.
4. PORTOLANI, M., MARZOCCHI, A., BARBANTI-BRODANO, G. & LA PLACA, M. 1974. Prevalence in Italy of antibodies to a new human papovavirus (BK virus). *J. Med. Microbiol.* **7**: 543-546.
5. PANÀ, A., D'ARCA, S. U., CASTELLO, C. & MALDARIZZI, B. 1976. Prevalence in the Rome healthy population of antibodies to a human polyoma-virus (BK strain). *Boll. Ist. Sieroter. Milanese*. **55**(1): 18-22.
6. GARDNER, S. D. 1981. The clinical aspects of reactivation of polyoma-viruses during therapeutic immunosuppression. *Abstracts, Fifth International Congress of Virology*. Strasbourg, France, August 2-7, 1981.
7. PANÀ, A., CASCIONI, C., SPLENDIANI, G., CASTELLO, C., IACOVONI, P. & MARRACINO, F. 1976. Infezioni virali negli emodializzati e nei trapiantati renali. *Rivista degli Ospedali*. Vol. **8**(7): 271-279.
8. DE STASIO, A., MASTROMARINO, P., PANÀ, A., SEGANTI, L., SINIBALDI, L., VALENTI, P. & ORSI, N. 1980. Characterization of a glycoprotein inhibitor present in human serum and active toward BK virus haemagglutination. *Microbiologica*. **3**: 293-305.

Selezione in agarosio di cellule linfoide umane trasformate *in vitro* dal virus di Epstein-Barr

GIUSEPPE RAGONA, SILVIA RESTA, MASSIMO ANDREONI e GIOVANNI ROCCHI

Istituto di Clinica Medica Generale e Terapia Medica III, Università degli Studi, Roma

Riassunto. - È stata tentata la selezione *in vitro* di cellule a carattere neoplastico a partire da linee cellulari linfoblastoidi di derivazione non neoplastica e ottenute mediante l'infezione *in vitro* con virus di Epstein-Barr. Ripetuti passaggi in un sistema culturale contenente agarosio hanno permesso la crescita selettiva di sottopopolazioni cellulari, caratterizzate da elevata efficienza di clonazione. Il trattamento delle cellule con esteri del forbolo (tumor promoters) non ha invece mostrato di contribuire all'espressione di simili caratteri.

Summary (Agarose selection of human lymphoid cells *in vitro* transformed by Epstein-Barr virus [EBV]). - *Lymphoblastoid cell lines obtained by in vitro transformation with Epstein-Barr virus display characteristics of tumor virus transformed cells. However, they greatly differ from Burkitt lymphoma cell lines which represent the product of an in vivo selection of EBV-transformed cells with neoplastic characteristics. We attempted to select, by repeatedly culturing in selective medium (agarose), cells with malignant characteristics from lymphoblastoid lines derived by in vitro EBV transformation of normal adult lymphocytes.*

I linfociti umani di tipo B infettati sia *in vivo* sia *in vitro* dal virus di Epstein-Barr (EBV) [1] acquistano *in vitro* caratteri simili a quelli di cellule trasformate da virus animali oncogeni a DNA. Tra questi caratteri è tuttavia assente la capacità di indurre tumori in ospiti sperimentali, ed è particolarmente ridotta la abilità di crescita *in vitro* su terreni di coltura di tipo semi-solido. Fanno tuttavia eccezione i linfociti da linfoma di Burkitt (BL) di individui sieropositivi per EBV, dalla cui coltivazione *in vitro* è possibile derivare linee cellulari che contengono il genoma virale, e che presentano ambedue le caratteristiche della oncogenicità e della capacità di crescita in substrati di tipo semisolido, una combinazione fenotipica comune peraltro ad ogni cellula di derivazione neoplastica.

Mediante l'impiego di terreni semi-solidi di coltura abbiamo tentato di stabilire *in vitro* un sistema selettivo che permettesse di isolare cloni cellulari ad elevato potenziale di crescita, da linee cellulari linfoblastoidi (LCL) derivate da cellule linfoide di origine non neoplastica, recentemente stabilizzate e coltivate attraverso ripetuti passaggi in terreno-agarosio. Nel medesimo sistema è stato anche impiegato il trattamento delle

cellule con esteri del forbolo (TPA), al fine di saggiare un eventuale contributo da parte di questi agenti chimici naturali alla promozione dello sviluppo di cellule EBV-trasformate, fenotipicamente alterate. Lo scopo degli esperimenti è di verificare la possibilità che cellule di tipo pre-neoplastico o neoplastico coesistano all'interno di popolazioni cellulari linfoblastoidi a carattere diploide e aventi integrato il genoma virale di EBV. Ciascuna linea cellulare saggiata in questo studio è stata ottenuta dall'infezione *in vitro* di linfociti umani di origine cordale, da sangue periferico di adulto oppure da tonsilla, non oltre 90 giorni dall'inizio degli esperimenti. Tutti i passaggi sono stati effettuati sia in presenza di TPA alle concentrazioni di 0,1-0,01 ng/ml, che in assenza di questa sostanza.

Cinque LCL su sei non sono sopravvissute alla « selezione selettiva » del terreno-agarosio oltre il 5° passaggio consecutivo. Il trattamento delle cellule con TPA non ha peraltro determinato, nel limite di tempo intercorso, alcuna modificazione a carico dell'abilità di crescita nel terreno selettivo. Una LCL derivata dall'immortalizzazione *in vitro* di cellule di tonsilla, ha rivelato nel corso degli esperimenti un'elevazione significativa dell'efficienza di clonazione nel terreno-agarosio. Tale efficienza di clonazione, a partire dal 5° passaggio consecutivo, si è stabilita intorno al 100 %. La capacità da parte di questa LCL di formare colonie in agarosio con tale efficienza è paragonabile solo a quella mostrata dalle cellule Raji, una linea linfoide derivata da tumore di Burkitt, inclusa come controllo nella esecuzione di ogni test, ma non ad alcun altro tipo a noi noto di LCL EBV-positiva con cariotipo normale diploide e propagata *in vitro* per un tempo inferiore a sei mesi. La trasformazione relativa a questo carattere sembra essere irreversibile, perché subcolture cellulari derivate dopo il 7° passaggio consecutivo della LCL in terreno-agarosio, e cresciute in terreno liquido, conservano stabilmente l'elevata efficienza di clonazione in agarosio, come la stessa LCL mantenuta in terreno-agarosio per oltre 15 passaggi consecutivi.

Il trattamento con TPA non appare aver contribuito anche in questa linea alla selezione di cellule con il carattere della elevata efficienza di clonazione, dato che queste stesse sono state selezionate in assenza dell'agente promotore. Nessuna modificazione spontanea

per questo carattere è stata osservata invece in cellule cresciute soltanto in terreno liquido. La sottopopolazione cellulare derivata dalla selezione in terreno-agarosio ha conservato un corredo cromosomico di tipo diploide-euploide, indicando pertanto che LCL diploidi di derivazione non neoplastica possono includere elementi cellulari suscettibili di esprimere, in determinate condizioni sperimentali, fenotipi di carattere maligno.

Questi risultati contribuiscono a documentare *in vitro* l'ipotesi che cellule linfoidi di natura neoplastica possono evolvere da una sottopopolazione di linfociti trasformati dal virus di Epstein-Barr.

Il presente lavoro è stato finanziato dal Progetto Finalizzato del C.N.R. «Controllo della crescita neoplastica», Contratto n. 82.00400.96.

BIBLIOGRAFIA

1. NILSSON, K. 1979. The nature of lymphoid cell lines and their relationship to the virus. In: *The Epstein-Barr virus*, M. A. Epstein & B. G. Achong (Eds.). Berlin.

Studi ecologici ed epidemiologici del virus Toscana, un arbovirus isolato da flebotomi

PAOLA VERANI(a), MARIA GRAZIA CIUFOLINI(a), LOREDANA NICOLETTI(a), MARCO BALDUCCI(b), GUIDO SABATINELLI(c), MARIO COLUZZI(c), PIETRO PACI(d) e LUIGI AMADUCCI(e)

(a) Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità, Roma;

(b) Virologo Epidemiologo, Regione Toscana, Firenze; (c) Istituto di Parassitologia, Università degli Studi, Roma;

(d) Divisione di Malattie Infettive, Ospedale S. Maria Nuova, Firenze;

(e) Istituto di Malattie Nervose e Mentali, Università di Firenze

Riassunto. - Si riportano i dati di uno studio svolto per identificare i focolai naturali del virus Toscana, un nuovo arbovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) isolato in natura da flebotomi. Inchieste sierologiche hanno dimostrato la capacità di questo virus di causare infezioni nell'uomo. Viene ipotizzato un suo ruolo eziologico in malattie acute del sistema nervoso centrale, a seguito della dimostrazione di incrementi anticorpali in sieri di casi di meningite e meningoencefalite, verificatisi durante i mesi estivi in provincia di Firenze. Nelle zone di possibile infezione dei pazienti sono stati isolati, da flebotomi della specie *Phlebotomus perniciosus*, 5 ceppi di virus Toscana e 4 ceppi di un virus non ancora identificato (ISS. Phl. 18). I due tipi di virus sono attivi simultaneamente nella stessa popolazione di insetti. Viene riportato un elevato tasso d'infezione dei flebotomi. Ambedue i virus sono stati isolati sia da flebotomi maschi sia da femmine; viene discusso questo ritrovamento come possibile meccanismo di mantenimento dei virus in natura.

Summary (Ecological and Epidemiological Studies of Toscana Virus, a *Phlebotomus*-transmitted Arbovirus). - Results of an ecological study carried out to identify the natural foci of Toscana virus, a new arbovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) isolated from sandflies are reported. Serologic surveys had shown that this virus can cause infection in humans. Furthermore seroconversions to Toscana virus in cases of acute CNS disease occurring during summer months in Florence province were demonstrated. In the areas of possible infection of patients 5 strains of Toscana virus and 4 strains of a not yet identified virus (ISS. Phl. 18) were isolated from wild caught sandflies (*Phlebotomus perniciosus*). It is remarkable the high rate of infection found in sandflies. Both viruses have been isolated both from male and female sandflies. These data are discussed as a possible mechanism of maintenance of the virus in nature.

INTRODUZIONE.

Nell'ambito di un programma di ricerca di focolai di arbovirus in natura, sono stati isolati, da flebotomi della specie *Phlebotomus perniciosus* raccolti nel 1971 in provincia di Grosseto, alcuni ceppi di uno stesso virus.

Tale virus è risultato diverso dagli altri due virus trasmessi da flebotomi precedentemente isolati in Italia, il virus Siciliano ed il virus Napoletano della febbre da flebotomi [1]. Nel 1980 il ceppo prototipo (ISS. Phl. 3) è stato registrato nell'« International Catalogue of Arboviruses » con il nome di virus Toscana, e, per le sue correlazioni antigeniche, classificato nel gruppo sierologico « *Phlebotomus fever* », appartenente tassonomicamente alla famiglia Bunyaviridae, genere Phlebovirus [2]. La patogenicità per l'uomo del virus Siciliano e Napoletano della febbre da flebotomi è ben documentata [3, 4]. La malattia ha un carattere benigno, per cui non si rende necessaria l'ospedalizzazione, e quindi i dati sull'incidenza e distribuzione geografica di queste infezioni provengono solo dai risultati di inchieste sierologiche. Benché l'uso del DDT durante le campagne di eradicazione della malaria in Italia, dopo la seconda guerra mondiale, abbia ridotto in molte zone la popolazione di flebotomi (e quindi la circolazione dei virus da essi trasmessi) dati sierologici ottenuti recentemente in varie regioni italiane sembrano suggerire il mantenimento di cicli naturali di questi virus [5].

Gli studi di patogenicità sperimentale del virus Toscana eseguiti in animali da laboratorio hanno rivelato uno spettro di patogenicità non comune per i Phlebovirus, dei quali è caratteristica invece la bassa virulenza per gli animali e le colture cellulari. Non è nota la patogenicità del virus Toscana per l'uomo, ma la sua capacità di causare infezioni è stata messa in evidenza con indagini sierologiche. I risultati di queste indagini, effettuate su limitati campioni di popolazione in alcune regioni italiane, hanno mostrato che l'attività del virus Toscana sembra essere circoscritta prevalentemente alla regione dove il virus è stato ritrovato in natura. In particolare, è stato dimostrato un alto tasso (24,8 %) di anticorpi neutralizzanti in un campione di popolazione proveniente dalla provincia di Firenze. La presenza di anticorpi in tutte le classi di età, con tassi di infezione più bassi nei giovani che negli adulti, sembra riflettere una situazione di endemicità del virus Toscana nella zona inclusa nello studio [6]. Data l'alta incidenza di anticorpi riscontrata nella popolazione, si è ricercata una possibile associazione del virus Toscana con

casi di malattia nell'uomo; in particolare, data l'evidenza di una potenzialità neurotrofica che è stata determinata in animali di laboratorio inclusi alcuni primati, sono stati presi in considerazione casi di malattie infettive acute del sistema nervoso centrale. Successivamente, nelle zone di probabile infezione dei pazienti, si sono ricercati i focolai naturali del virus. In questo lavoro sono riportati i risultati di queste indagini.

MATERIALI E METODI.

Diagnosi sierologica di malattie neurologiche. - I campioni di siero sono stati ottenuti da individui salassati almeno due volte dopo l'insorgenza della malattia. I pazienti, con diagnosi di affezione acuta del sistema nervoso centrale, erano ricoverati nella Divisione Malattie infettive dell'Ospedale S. Maria Nuova di Firenze, nell'Istituto di Malattie Nervose e Mentali dell'Università di Firenze e in alcuni ospedali della provincia. Le reazioni sierologiche usate (inibizione dell'emoagglutinazione, fissazione del complemento e neutralizzazione) sono state eseguite come descritto precedentemente [1, 6].

Raccolta dei vettori, isolamento virale e identificazione dei virus isolati. - Le raccolte di flebotomi sono state eseguite manualmente, con l'aiuto di un aspiratore nel 1980 e, nel 1981, anche con l'ausilio di « CDC light trap » in ambienti di ricovero di animali domestici. Gli insetti sono stati conservati congelati a -70°C fino al momento del procedimento per l'isolamento virale. Quindi sono stati suddivisi per sesso e su una parte del campione corrispondente a circa il 20 % di un totale di 759 esemplari raccolti è stata effettuata l'identificazione di specie. I flebotomi utilizzati per l'identificazione erano in gran parte di sesso maschile. Le tecniche di isolamento virale e la identificazione sierologica dei virus isolati sono state eseguite come precedentemente descritto [1].

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Casi clinici. - Nella Tab. 1 sono riportati, per mese di insorgenza, i casi di malattie neurologiche acute a sospetta eziologia virale, giunti alla nostra osservazione nel periodo 1977-80. Come è noto, l'ipotesi di una eziologia virale di queste forme cliniche si basa principalmente su dati clinici. Nel 12,1 % dei casi giunti all'osservazione, si è potuta ipotizzare una infezione recente da virus Toscana basata sull'osservazione di sierconversioni o di aumenti del titolo anticorpale in campioni successivi di siero, rilevati in una o più delle prove sierologiche usate (inibizione dell'emoagglutinazione, fissazione del complemento, neutralizzazione). La non idoneità di una singola tecnica sierologica per svelare le possibili sierconversioni è nota per altre infezioni causate da arbovirus della famiglia Bunyaviridae [7]. I casi diagnosticati come positivi risultavano concentrati nei mesi estivi (da giugno ad ottobre), con elevate percentuali di incidenza nei mesi di luglio, agosto e settembre. Tali dati sono compatibili con l'ipotesi che si tratti di infezioni trasmesse da artropodi. La diagnosi clinica dei 16 casi risultati sierologicamente positivi per il virus Toscana era per la maggior parte di essi

Tabella 1. - *Casi di affezione acuta del SNC sierologicamente positivi per il virus Toscana, per mese d'insorgenza.*

M E S E	N. casi (a)	N. casi pos. (b)	% positivi
Gennaio	9	0	—
Febbraio	7	0	—
Marzo	16	0	—
Aprile	8	0	—
Maggio	9	0	—
Giugno	18	2	11,1
Luglio	20	6	30,0
Agosto	14	4	28,5
Settembre	8	3	37,5
Ottobre	11	1	9,0
Novembre	9	0	—
Dicembre	3	0	—
TOTALE ...	132	16	12,1

(a) Casi verificatisi dal 1977 al 1980.

(b) Sieroconversioni.

di meningite a liquor limpido e solo in due casi di meningoencefalite; undici pazienti erano uomini e cinque donne, tutti adulti.

Isolamento da vettori. - È suggestiva l'ipotesi del ruolo eziologico del virus Toscana nel causare queste sindromi neurologiche, anche se non possiamo escludere l'ipotesi di una coincidenza dei due eventi, non avendo ancora notizie sul numero di infezioni subcliniche che si verificano nella zona durante lo stesso periodo dell'anno. Analizzando le aree di provenienza e quindi di possibile infezione dei pazienti, si è notato che essi provenivano da località della piana dell'Arno verso i limiti collinari ad occidente di Firenze, corrispondenti in gran parte al comune di Sesto Fiorentino. Si tratta di zone prevalentemente agricole, ma densamente abitate. Nelle estati 1980 e 1981 si è effettuata una raccolta di artropodi vettori, con lo scopo di individuare le specie presenti e di isolare ceppi virali.

Tutti i flebotomi catturati e identificati appartenevano alla specie *Phl. perniciosus*, la stessa da cui era stato isolato, in provincia di Grosseto, il ceppo prototipo del virus Toscana. In totale sono stati esaminati per l'isolamento virale 609 flebotomi (467 femmine e 142 maschi) suddivisi in 31 pool (Tab. 2). Da questi insetti sono stati isolati 9 ceppi virali: 5 ceppi sono stati identificati come virus Toscana; 4 ceppi (indicati con la sigla del ceppo prototipo ISS, Phl. 18) sono risultati diversi sia dal virus Toscana che dai virus Siciliano e Napoletano della febbre da flebotomi. Con ulteriori saggi sierologici si è provata l'appartenenza del virus ISS, Phl. 18 al gruppo sierologico *Phl. fever* degli arbovirus: la sua identificazione è quindi ancora in corso. Da un pool di 48 flebotomi sono stati isolati sia un ceppo di virus Toscana che un ceppo di virus ISS, Phl. 18. Gli isolamenti virali sono stati ottenuti in ambedue gli anni nei periodi di maggiore attività del *Phl. perniciosus*. Ambedue i virus sono stati isolati nei due anni

Tabella 2. - *Isolamenti virali da Phl. perniciosus raccolti nell'area di Sesto Fiorentino.*

DATA DI RACCOLTA	N. flebo- tomi	Virus isolati		TOTALI
		Toscana	ISS. Phl. 18	
Luglio 1980	148	2 (1,3) (a)	2 (1,3)	4 (2,7)
Agosto 1980	117	1 (0,8)	0	1 (0,8)
Luglio 1981	61	0	0	0
Agosto 1981	259	2 (0,8)	2 (0,8)	4 (1,5)
Settembre 1981	24	0	0	0
TOTALE ...	609	5 (0,8)	4 (0,6)	9 (1,5)

(a) Tasso minimo d'infezione per 100 flebotomi.

nei quali si è protratto il presente studio. Si può quindi concludere che nella zona in studio vi sono focolai stabili dei due virus, attivi simultaneamente nella stessa popolazione di flebotomi.

Va altresì notato il numero relativamente alto di isolamenti virali ottenuti da un campione limitato di flebotomi, corrispondente a circa un isolamento per 67 insetti. Un simile tasso di infezione dell'artropode vettore è un evento abbastanza raro per arbovirus circolanti in zone temperate. L'isolamento virale è stato tentato inoculando contemporaneamente i pool dei flebotomi nel topino neonato ed in colture cellulari (linea VERO), poiché è stata riportata una maggiore sensibilità del sistema VERO rispetto al topino neonato per l'isolamento di alcuni Phlebovirus [8]. Nel caso del virus Toscana, il sistema di isolamento in coltura di cellule VERO sembra fornire risultati migliori. Infatti, due ceppi di virus sono stati isolati in cellule VERO e non in topo. Tutti i ceppi virali sono stati reisolati dalle

sospensioni originali dei flebotomi, confermando la validità degli isolamenti.

I campioni di flebotomi raccolti durante l'estate 1981 sono stati saggiati dividendo gli insetti per sesso. Un ceppo di virus Toscana ed un ceppo di virus ISS. Phl. 18 sono stati isolati e reisolati da pool di maschi. Tale dato, benché completamente nuovo per i virus in questione, è in accordo con quanto riportato per altri arbovirus del gruppo « Phlebotomus fever », incluso il virus Siciliano della febbre da flebotomi [9]. Poiché i flebotomi maschi non succhiano il sangue, questi isolamenti sono stati interpretati come prova di trasmissione transovarica di questi virus in natura. Tali dati ipotizzano che l'ecologia dei virus del gruppo « Phlebotomus fever » sia completamente differente dal ciclo vertebrato-insetto presunto per la maggior parte degli arbovirus. La trasmissione transovarica fornisce un meccanismo efficiente sia per spiegare il mantenimento del virus durante il periodo di inattività dei vettori, sia per assicurare la loro sopravvivenza in assenza di ospiti suscettibili, in un contesto naturale densamente abitato come quello della zona in studio.

Questi dati contribuiscono all'ulteriore conoscenza dell'ecologia ed epidemiologia del virus Toscana, avvalorando l'ipotesi che il suo vettore principale sia il *Phl. perniciosus*, unico artropode da cui questo virus è stato finora isolato. Essi inoltre suggeriscono una costante attività stagionale del virus, il cui meccanismo di sopravvivenza in natura risiede almeno in parte in una trasmissione verticale nella popolazione di flebotomi. Inoltre, nella medesima popolazione di flebotomi risulta attivo un altro virus non ancora identificato. Dopo che era stata accertata la capacità del virus Toscana di causare infezioni nell'uomo, si è ottenuta evidenza sierologica che esso possa essere associato a manifestazioni cliniche neurologiche. Tale dato viene avvalorato anche dal fatto che sono stati identificati focolai del virus nelle zone di possibile infezione dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. VERANI, P., LOPES, M. C., NICOLETTI, L. & BALDUCCI, M. 1980. Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy. I. Isolation and characterization of a Sandfly Fever Naples-like virus. *Zbl. Bakt. Suppl.* 9: 195-201.
2. BERGE, T. O. (Ed.) 1975. International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates, 2nd ed. Publication no. (CDC) 75-8301. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Md.
3. BARTELLONI, P. J. & TESH, R. B. 1976. Clinical and serologic responses of volunteers infected with Phlebotomus fever virus (Sicilian type). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 456-462.
4. SABIN, A. B. 1951. Experimental studies on Phlebotomus (Pappataci, Sandfly) fever during World War II. *Arch. Ges. Virusforsch.* 4: 367-410.
5. VERANI, P., BALDUCCI, M. & LOPES, M. C. 1979. Arboviruses in Italy. In: *Arctic and tropical arboviruses*. E. Kurstak (Ed.). Academic Press, New York, pp. 101-121.
6. NICOLETTI, L., VERANI, P., CIUFOLINI, M. G., LOPES, M. C. & ZAMPETTI, P. 1980. Studies on Phlebotomus - transmitted viruses in Italy. II. Serologic status of human beings. *Zbl. Bakt. Suppl.* 9: 203-208.
7. CALISHER, C. H. & BAILEY, R. E. 1981. Serodiagnosis of La Crosse virus infections in humans. *J. Clin. Microbiol.* 13: 344-350.
8. TESH, R. B., CHANIOTIS, B. N., PERALTA, P. H. & JOHNSON, K. M. 1974. Ecology of viruses isolated from Panamanian Phlebotomine Sandflies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 258-269.
9. TESH, R. B., SAIDI, S., JAVADIAN, E. & NADIM, A. 1977. Studies on the epidemiology of Sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 282-287.