

## **Isolamento ed identificazione degli agenti eziologici virali in un episodio di mortalità infantile verificatosi a Napoli dall'ottobre 1978 all'aprile 1979**

G. VECCHIO (a), A. FUSCO (a), M. FERRENTINO (a), G. MANCINI (b), P. VERANI (b),  
M. RAPICETTA (b), G. ARANGIO-RUIZ (b), M. C. LOPES (b), M. G. CIUFOLINI (b),  
I. DONATELLI (b), G. MORACE (b), L. NICOLETTI (b) e C. ROZERA (b),

(a) *Cattedra di Virologia Oncologica, Istituto di Patologia Generale, II<sup>a</sup> Facoltà di Medicina  
e Chirurgia, Università di Napoli.*

(b) *Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali, Istituto Superiore di Sanità.*

### **INTRODUZIONE**

Negli ultimi mesi del 1978 si è verificato, nella provincia di Napoli, un alto numero di decessi di bambini al disotto di due anni, con una sintomatologia apparentemente simile e con un decorso brevissimo. La diagnosi iniziale formulata dai clinici del reparto di rianimazione, dove questi bambini venivano ricoverati, fu di sospetta encefalite o encefalopatia di probabile eziologia virale in concomitanza con un « distress » respiratorio. Il decorso rapido della malattia non permetteva però il rilevamento dei segni clinici caratteristici di processi infiammatori del sistema nervoso centrale (SNC), né l'esame del liquor (quando disponibile) rivelava alterazioni tipiche di infezioni virali. Questo orientamento diagnostico clinico, la scarsità dei risultati delle analisi di laboratorio e la mancanza di dati anatomo-patologici, indirizzavano di conseguenza le ricerche verso i virus maggiormente implicati nelle affezioni acute del SNC. Infatti le notizie epidemiologiche disponibili e la sintomatologia non facevano inquadrare i casi in una sindrome riportabile ad un singolo agente eziologico. Si indirizzavano perciò i tentativi di isolamento virale, per quanto riguardava sia il tipo di materiale da analizzare che il tipo di colture cellulari e di animali da inoculare verso gli enterovirus, i virus herpes, e gli arbovirus. La ristretta classe di età colpita, l'alto indice di mortalità, la distribuzione sporadica dei casi, che sembrava escludere il contagio interumano, erano tutti elementi non completamente compatibili con le varie ipotesi virali prospettate. Infatti i risultati degli esami istologici,

quando si resero disponibili, non confermarono la diagnosi di affezione acuta del SNC, ma evidenziarono, in molti casi, chiare lesioni a livello del parenchima polmonare.

Inoltre, dalla fine del dicembre 1978, dopo un periodo di 20 giorni in cui l'episodio sembrava risolto, iniziarono nuove e sempre più numerose segnalazioni di morti infantili, che apparivano conseguenti ad una affezione di tipo respiratorio, ipotesi diagnostica suffragata rapidamente da reperto istopatologico. Le ricerche virologiche si indirizzarono allora verso l'isolamento di agenti responsabili di infezioni acute respiratorie.

Sono descritti in questo lavoro i risultati delle ricerche virologiche effettuate su campioni prelevati da bambini ricoverati al reparto di rianimazione dell'Ospedale Santobono di Napoli e su campioni prelevati da bambini ricoverati per malattie respiratorie acute in reparti pediatrici di alcuni ospedali napoletani, durante il periodo di massima incidenza della mortalità.

## MATERIALI E METODI

### *Popolazione esaminata*

Sono stati esaminati 123 bambini di età compresa, per la maggior parte, fra 0 e 24 mesi: 91 provenienti dal reparto di rianimazione dell'Ospedale Santobono di Napoli (RIA) fra l'ottobre 1978 e l'aprile 1979 e 32 ricoverati per affezioni acute a carico dell'apparato respiratorio fra il gennaio ed il marzo 1979 in vari ospedali pediatrici napoletani.

### *Campioni*

Per ciascun caso esaminato tamponi faringei e/o aspirati bronchiali sono stati prelevati all'atto del ricovero; frammenti autoptici di tessuto polmonare, di bulbo e di corteccia cerebrale sono stati prelevati entro 3-6 ore dal decesso (per quanto riguarda i casi esaminati prima del 22 gennaio 1979 entro le 24-36 ore dal decesso).

I campioni esaminati a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità sono stati trasportati in ghiaccio secco e conservati alla temperatura di -80 °C fino al momento dell'inoculo. A partire dal mese di gennaio 1979 la maggior parte dei campioni è stata esaminata in doppio (a Roma ed allo Istituto di Patologia Generale dell'Università di Napoli). I campioni esaminati a Napoli sono stati inoculati immediatamente senza precedente congelamento.

I tamponi faringei, al momento dell'inoculo, sono stati stemperati in soluzione fisiologica tamponata (PBS) contenente una concentrazione

tripla di antibiotici (300 U/ml di penicillina, 300  $\mu\text{g/ml}$  di streptomina, 6  $\mu\text{g/ml}$  di fungizone) ed il 5 % di siero inattivato di pollo. Gli aspirati bronchiali sono stati inoculati direttamente previa aggiunta di antibiotici.

I campioni autoptici, dopo lavaggio in soluzione salina di Hank's contenente una concentrazione tripla di antibiotici, sono stati pestati in un mortaio refrigerato e risospesi al 10 % (peso/volume) in soluzione salina di Hank's con il 5 % di siero inattivato di pollo. La sospensione è stata centrifugata a 3000 xg per 20' in centrifuga refrigerata ed il sopranatante è stato usato per l'inoculazione nei sistemi *in vivo* ed *in vitro*.

### Sistemi di isolamento

1) Colture cellulari: tutti i campioni sono stati inoculati simultaneamente in tre tipi di colture di tessuto:

a) colture primarie di rene di scimmia (*Cercopithecus aethiops* e/o *Macaca mulatta*);

b) colture di linea HEP-2, ottenute dall'American Type Culture Collection;

c) colture di fibroblasti diploidi di origine umana.

Il terreno di crescita impiegato è stato per tutte le colture Eagle *minimal essential medium* (MEM) con 0,11 % di bicarbonato, 10 % di siero vitello fetale (SVF), 100 U/ml di penicillina, 100  $\mu\text{g/ml}$  di streptomina e 2  $\mu\text{g/ml}$  di fungizone. Il terreno di mantenimento è stato MEM con 0,22 % di bicarbonato, 0,5-1 % di SVF, 100 U/ml di penicillina, 100  $\mu\text{g/ml}$  di streptomina e 2  $\mu\text{g/ml}$  di fungizone.

Ciascun campione, preparato come precedentemente descritto, è stato inoculato, nella quantità di 0,1 ml per tubo, in 4 tubi di ogni coltura cellulare impiegata. Dopo 1 ora di assorbimento a 35 °C, 2 ml di terreno di mantenimento venivano aggiunti ad ogni tubo. Le colture venivano incubate a 35 °C e l'osservazione era protratta per 20-25 giorni, anche mediante passaggio in colture nuovamente allestite.

Al 7° e 15° giorno dall'inoculazione, sulle colture di rene di scimmia è stata effettuata la prova di emoadsorbimento con emazie di cavia sospese allo 0,4 % in soluzione fisiologica.

2) Uova embrionate di pollo: ciascun campione è stato inoculato nella cavità amniotica di uova in 12ª giornata di incubazione nella quantità di 0,1 ml/uovo. Le uova inoculate sono state incubate 72 ore a 33 °C ed i liquidi amniotici prelevati sono stati saggiati per la presenza di virus emoagglutinanti con emazie di pollo sospese allo 0,5 % in soluzione fisiologica. Per tutti

i campioni è stato eseguito un secondo passaggio in cavità amniotica e, nei casi di emoagglutinazione positiva, un passaggio nella cavità allantoidea di uova in 10<sup>a</sup> giornata di incubazione.

3) Topini neonati: i campioni di liquor ed i campioni autoptici sono stati saggiati in covate di topini di 24-48 ore. Ogni topino veniva inoculato con 0,01 ml per via intracerebrale ed intraperitoneale. I topini venivano esaminati giornalmente per un periodo di due settimane. I topini con sospetti segni di malattia erano sacrificati, ed il cervello e la carcassa (priva di pelle e visceri) omogenati al 10 % venivano inoculati in nuove covate di topini.

#### *Identificazione dei virus isolati*

I virus isolati sono stati caratterizzati preliminarmente, a seconda del tipo di virus sospettato:

a) mediante il loro spettro di crescita in colture di tessuto (HEp-2, colture primarie di rene di scimmia, fibroblasti diploidi umani, RK13), in uova embrionate di pollo (inoculazione in allantoide o su membrana corionallantoidea) e in topino;

b) mediante lo spettro di emoagglutinazione (emazie di scimmia, ratto);

c) mediante il tipo di inclusioni cellulari prodotte;

d) mediante l'osservazione diretta al microscopio elettronico delle particelle virali [1].

La tipizzazione è stata ottenuta mediante prove sierologiche utilizzando antisieri specifici, o preparati nel laboratorio od ottenuti da laboratori di referenza internazionali.

Sono state eseguite, a seconda dei casi, prove di neutralizzazione *in vitro* o *in vivo*, prove di fissazione del complemento, prove di inibizione dell'emoagglutinazione, prove di immunofluorescenza diretta.

## RISULTATI

Nella Tab. I sono riportati il numero ed il tipo dei virus isolati dai pazienti del RIA e da quelli ricoverati nei reparti pediatrici. La maggior parte dei virus isolati appartiene al gruppo degli agenti responsabili di affezioni respiratorie. In totale si è avuto isolamento virale nel 24,4 % dei casi. La percentuale di isolamento è maggiore nei soggetti ricoverati nei reparti pediatrici (31,2 %) rispetto a quella rilevata nei pazienti del RIA (22,0 %). Questa differenza potrebbe essere in rapporto con l'omogeneità della dia-

TABELLA I

## Isolamenti virali da pazienti provenienti dal RIA e dai reparti pediatrici

PROVENIENZA	N. pazienti	N. isolamenti	VIRUS ISOLATI					
			RS	Adeno	Herpes	Influenza	Parainfluenza	Altri
RIA . . . . .	91	20 (a) (22,0)	7 (7,7)	5 (5,5)	4 (4,4)	1 (1,1)	—	(b) 3 (3,3)
Reparti pediatrici . . . . .	32	10 (31,2)	2 (6,2)	1 (3,1)	1 (3,1)	3 (9,4)	2 (6,2)	(c) 1 (3,1)
TOTALI . . .	123	30 (24,4)	9 (7,3)	6 (4,9)	5 (4,1)	4 (3,2)	2 (1,6)	4 (3,2)

(a) In parentesi % di isolamento.

(b) Coxsackie A9, Coxsackie A10, Polio 3.

(c) Micoplasma.

gnosi chiaramente di affezione respiratoria (bronecopolmonite, bronchiolite), nei bambini ricoverati nei reparti pediatrici a differenza di quelli ricoverati nel RIA, che, per la particolarità delle prestazioni, accoglie soggetti con la complessa sintomatologia di una fase terminale, legata ad una affezione non sempre facilmente diagnosticabile.

Analizzando il tipo di isolamenti effettuati, si osserva una maggiore frequenza del virus respiratorio sinciziale (RS) (7,3 %), degli adenovirus (4,9 %) e di virus dell'herpes simplex di tipo 1 (4,1 %). I virus influenzali e parainfluenzali sono stati isolati quasi esclusivamente dai pazienti dei reparti pediatrici.

Il maggior numero di isolamenti virali si è ottenuto nei mesi di gennaio e febbraio, in concomitanza con l'elevato numero di casi giunti all'osservazione (Fig. 1). Dai casi verificatisi dall'ottobre al dicembre 1978 (provenienti tutti dal RIA), si sono isolati soltanto 3 virus, di cui solo l'adenovirus, identificato come tipo 2, è comunemente associato a forme respiratorie. La distribuzione per età dei pazienti esaminati e degli isolamenti virali è riportata nella Fig. 2. Si nota che la maggior parte dei casi giunti all'osservazione era di età inferiore all'anno e che il maggior numero di isolamenti virali è stato effettuato in questo gruppo di pazienti. In particolare si rileva che i 6 ceppi di adenovirus sono stati isolati da pazienti entro l'ottavo mese di età. I ceppi di virus RS, herpes simplex e influenzali provenivano da pazienti di tutte le età, anche se è da notare che il virus RS è stato isolato con maggiore frequenza dal gruppo di soggetti di età compresa tra 3 e 8 mesi.

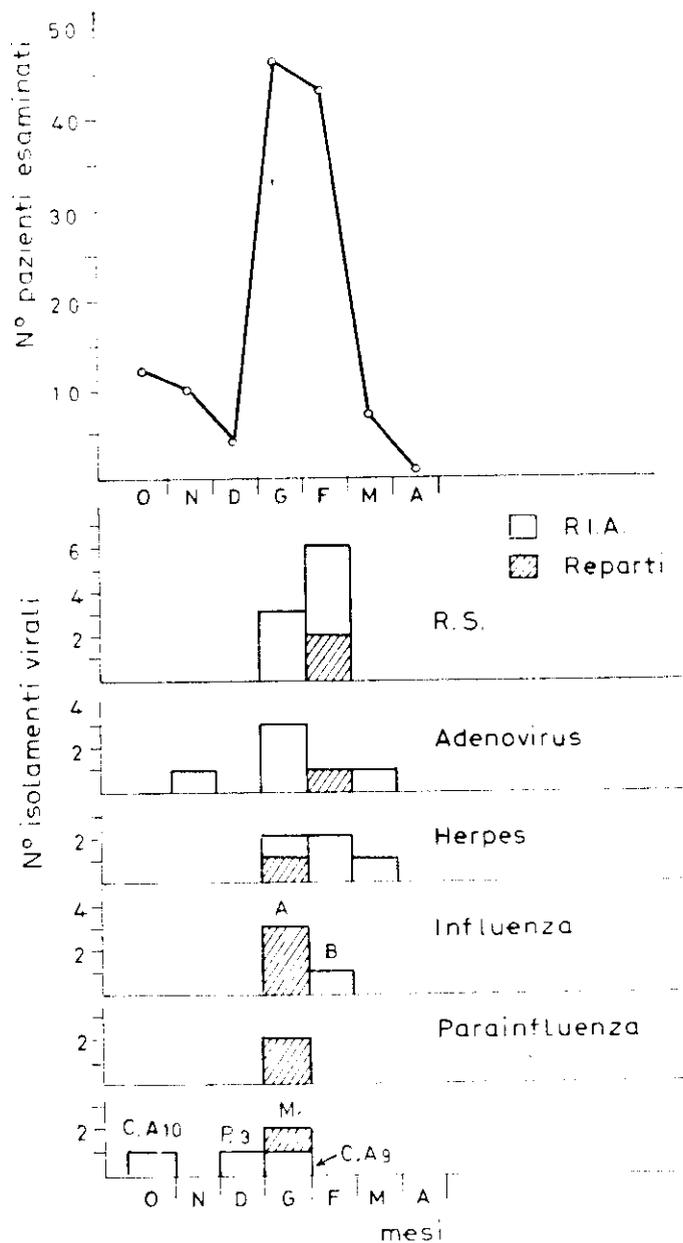


Fig. 1. — Distribuzione mensile degli isolamenti virali da 123 pazienti esaminati.

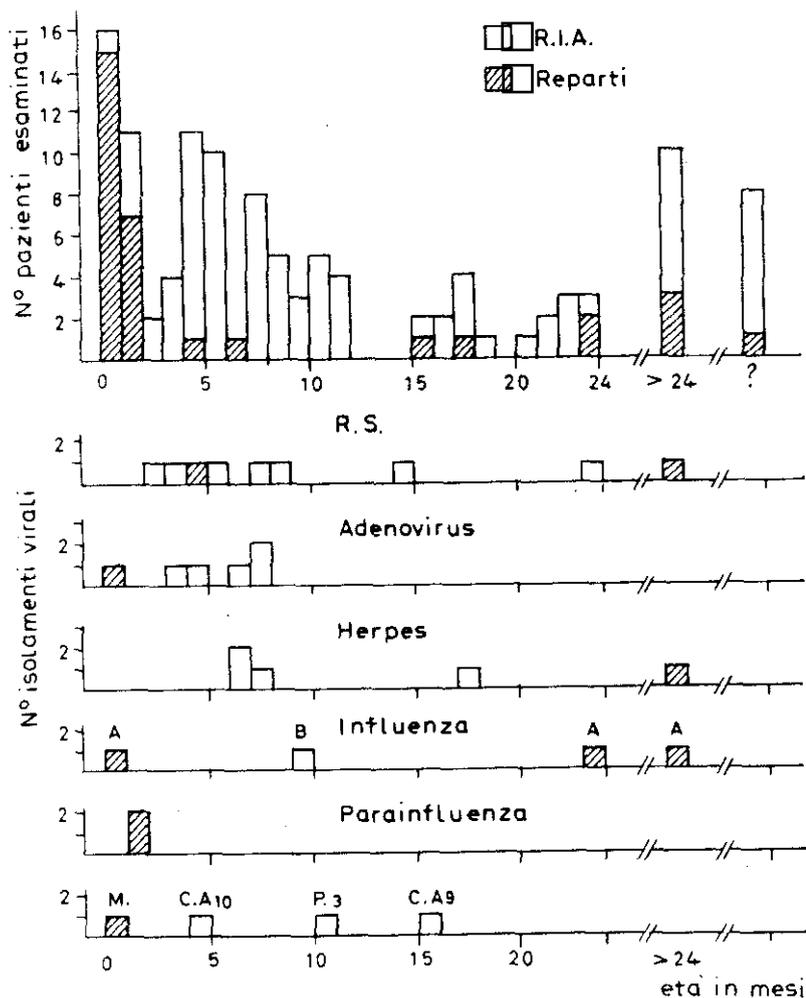


Fig. 2. — Distribuzione per età degli isolamenti virali da 123 pazienti esaminati.

Nella Tab. 2 sono riportati il numero ed il tipo dei campioni, relativi a 123 pazienti, esaminati per l'isolamento di virus ed il numero ed il tipo dei ceppi virali da essi isolati. Alcuni campioni, relativi allo stesso soggetto, sono stati esaminati in doppio a Napoli ed a Roma, dando luogo, in alcuni casi, a due isolamenti dello stesso virus. Solo in due casi si è ottenuto l'isolamento di 2 virus diversi da campioni dello stesso soggetto (virus herpes simplex ed influenzale H1N1 da tampone faringeo di un paziente venuto a guarigione; virus RS da tampone faringeo e adenovirus dal polmone di

TABELLA 2

## Isolamenti virali da 288 campioni esaminati provenienti da 123 pazienti

CAMPIONE	N. campioni esaminati	CEPPI VIRALI ISOLATI						TOTALI
		RS	Adeno	Herpes	Influenza	Parainfluenza	Altri	
Tampone faringeo . . .	101	7	3	5	(a,b,b,b)4	2	(c, d, e, f) 4	25
Aspirato bronchiale . .	17	—	—	—	—	—	—	—
Polmone . . . . .	89	2	7	2	—	—	(c,e,d) 3	14
Liquor . . . . .	26	—	—	—	—	—	(d) 1	1
Bulbo . . . . .	26	—	—	—	—	—	—	—
Corteccia cerebrale . .	29	—	—	—	—	—	(c, d) 2	2
TOTALI . . . . .	288	9	10	7	4	2	10	42

(a) Influenza B.

(b) Influenza A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>).

(c) Coxsackie A9.

(d) Coxsackie A10.

(e) Polio 3.

(f) Micoplasma.

un paziente deceduto al RIA). In tre soggetti è stato isolato lo stesso virus dal tampone faringeo e dal polmone (rispettivamente un adenovirus di tipo 2, un adenovirus di tipo 7, ed un virus herpes simplex). È da sottolineare che 7 ceppi di adenovirus (da campioni di 5 soggetti), due ceppi di virus RS e due ceppi di virus herpes simplex sono stati isolati da materiale autoptico polmonare. Tutti gli altri isolamenti di virus respiratori sono stati ottenuti da tampone faringeo.

Due virus coxsackie, tipo A9 e A10, sono stati isolati da vari campioni di due soggetti. Tranne che in questi due casi, non si sono ottenuti altri isolamenti dal liquor e da segmenti del SNC.

Se si mettono in relazione i virus isolati con l'esito della malattia, si nota che si è avuto lo stesso numero di isolamenti dai deceduti e dai guariti, anche se questi ultimi sono in numero minore (Tab. 3).

Si nota inoltre che gli isolamenti di adenovirus sono stati ottenuti in maggioranza nei casi di decesso, che gli isolamenti di virus RS e di virus herpes simplex sono stati ottenuti circa in egual numero sia nei deceduti, sia nei sopravvissuti, e che i virus influenzali e parainfluenzali sono invece stati isolati nei soggetti venuti a guarigione, tranne in un caso.

Nella Tab. 4 vengono riportati gli isolamenti virali in rapporto ai sistemi cellulari o *in vivo* utilizzati. I fibroblasti diploidi umani hanno rappresentato il sistema di isolamento più adatto per tutti i virus respiratori. È interessante considerare che questo sistema, nella nostra esperienza, si è rilevato ancora più utile delle cellule HEp-2 per quanto concerne l'isolamento del virus RS.

TABELLA 3

## Relazione fra isolamenti virali e esito della malattia

	N. pazienti	VIRUS ISOLATI					
		RS	Adeno	Herpes	Influenza	Parainfluenza	Altri
Deceduti . . . . .	72	4	5	2	(a) 1	—	(b) 3
Guariti . . . . .	51	5	1	3	(c) 3	2	(d) 1
TOTALI . . .	123	9	6	5	4	2	4

(a) Influenza B.

(b) Coxsackie A9, Coxsackie A10, Polio 3.

(c) Influenza A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>).

(d) Micoplasma.

TABELLA 4

## Isolamenti virali in relazione ai sistemi di isolamento utilizzati

SISTEMA DI ISOLAMENTO	Totale ceppi virali isolati	RS	Adeno	Herpes	Influenza	Parainfluenza	Altri
Rene primario di scimmia . . .	13	—	1	5	—	2	(a, b) 5
HEp-2 . . . . .	10	3	6	—	—	—	(c) 1
Fibroblasti diploidi umani . . .	11	6	3	2	—	—	—
Uova embrionate di pollo . . .	4	—	—	—	4	—	—
Topo neonato . . . . .	4	—	—	—	—	—	(d) 4
TOTALI . . .	42	9	10	7	4	2	10

(a) Micoplasma.

(b) Coxsackie A9 (4 ceppi).

(c) Polio 3.

(d) Coxsackie A10 (4 ceppi).

Nella Fig. 3 viene mostrato il tipico effetto citopatico provocato dal virus RS in cellule HEP-2, vale a dire la formazione di sincizi. Nella Fig. 4 viene mostrato l'effetto citopatico provocato dallo stesso virus su fibroblasti diploidi umani. In questo sistema cellulare l'effetto è molto netto e caratteristico, e consiste in una degenerazione massiva del monostato cellulare caratterizzata dalla rarefazione dei fibroblasti tra i cui prolungamenti compaiono raggruppamenti di cellule arrotondate e detriti cellulari.

#### DISCUSSIONE

Nel presente lavoro sono stati esaminati due differenti campioni di pazienti in età pediatrica. Il primo è costituito da bambini ricoverati nel reparto di rianimazione dell'Ospedale Santobono di Napoli nel periodo ottobre 1978-aprile 1979 con una sintomatologia prevalentemente neurologica, conseguente spesso ad un improvviso aggravamento di una banale affezione respiratoria, culminante rapidamente, nell'80 % dei casi circa, in coma e morte. Il secondo gruppo è costituito da pazienti ricoverati in vari ospedali pediatrici napoletani per affezioni respiratorie acute durante il periodo gennaio-marzo 1979, la maggior parte dei quali è stata dimessa con guarigione completa.

In questi due gruppi di pazienti sono state effettuate indagini rivolte all'isolamento di virus allo scopo di accertare l'eziologia di queste affezioni e di verificare se gli agenti virali eventualmente isolati dai pazienti deceduti nel reparto di rianimazione dell'Ospedale Santobono fossero gli stessi responsabili delle sindromi chiaramente respiratorie dei bambini ricoverati nei reparti pediatrici. Dall'analisi riportata nella Tab. 1 risulta che tutti i più comuni agenti virali respiratori dell'infanzia (adenovirus, virus RS, virus herpes simplex) sono stati isolati sia da pazienti ricoverati in rianimazione sia da quelli dei reparti pediatrici. Virus influenzali e parainfluenzali sono stati isolati invece soltanto dai pazienti ricoverati nei reparti pediatrici, ad eccezione di un ceppo di virus influenzale di tipo B isolato da un bambino in cui l'esame autoptico polmonare ha rilevato importanti segni di pneumopatia interstiziale [2]. Inoltre sono stati isolati da pazienti del reparto di rianimazione agenti virali meno comunemente implicati in affezioni respiratorie infantili, quali i virus coxsackie A9 e A10. Va ricordato che, in questi due casi, l'isolamento del virus è stato ottenuto sia dal tessuto nervoso (e liquor) sia dal polmone, denotando cioè una infezione generalizzata. Fattori concomitanti (deficienze immunologiche, terapia cortisonica, ecc.) possono avere contribuito alla generalizzazione dell'infezione.

Benché il campione esaminato, relativo ai reparti di pediatria, sia relativamente piccolo, sembra lecito concludere che più di un agente virale

responsabile di infezioni respiratorie sia circolato nel periodo gennaio-marzo 1979 nel comune e nella provincia di Napoli.

Per quanto riguarda i bambini ricoverati nel reparto di rianimazione è opportuno considerare che questo gruppo di pazienti è più eterogeneo rispetto a quello dei pazienti ricoverati in ospedali pediatrici, sia per quanto riguarda la sintomatologia con cui questi bambini si sono presentati, sia per il più lungo arco di tempo (ottobre 1978-aprile 1979) durante il quale si sono verificati i ricoveri. Anche in questo gruppo di pazienti si è rilevata una pluralità di isolamenti virali con una maggiore frequenza del virus RS rispetto agli altri virus.

Tra i vari virus respiratori, il virus RS è ritenuto, in effetti, l'agente patogeno più frequente di bronchioliti fatali nei bambini [3]. Tuttavia è interessante notare che nei soggetti esaminati, la maggioranza degli isolamenti da materiale autoptico polmonare è stata di adenovirus più che di virus RS. È noto, d'altra parte, che alcuni adenovirus possono provocare pneumopatie mortali nei bambini alla stessa stregua del virus RS [4-6]. È interessante, a questo proposito, sottolineare come da alcune recenti ricerche è risultato che tanto l'adenovirus di tipo 3 quanto il virus RS sono capaci di replicarsi attivamente in colture di pneumociti umani di tipo II che sono le cellule responsabili della produzione del « surfactant ». È possibile pertanto che l'infezione prodotta da questi virus, che può evolvere in una polmonite o in una bronchiolite, comporti una distruzione selettiva o un danno grave proprio di queste cellule [7].

Anche il virus herpes simplex è stato isolato da materiale autoptico polmonare di due casi di bambini deceduti nel reparto di rianimazione. Questo tipo di virus, che è certamente responsabile di affezioni respiratorie acute dell'età adulta [8,9], viene frequentemente riscontrato anche nelle affezioni respiratorie acute infantili [10]. Tanto nel caso dei ricoverati nei reparti pediatrici, quanto in quello dei bambini ricoverati in rianimazione, le indagini sugli isolamenti virali sono state completate con indagini sierologiche effettuate mediante la tecnica della fissazione del complemento. La bassa frequenza di sier conversionsi ottenute, spiegabile in parte con la specifica età dei bambini colpiti, età nella quale è raro poter dimostrare un aumento del titolo di anticorpi fissanti il complemento [11] ed in parte con l'impossibilità, in molti casi, di ottenere i due sieri indispensabili per effettuare questa ricerca, rende poco significativo questo tipo di indagini che, pertanto non sono state qui riportate.

Poiché è stato sottolineato che durante l'inverno 1978-1979 si è registrato un notevole aumento dei ricoveri ospedalieri per bronchioliti e polmoniti dell'infanzia nella città di Napoli (Relazione del Consiglio Superiore di Sanità) e poiché è noto che questo segno rappresenta una chiara indicazione epidemiologica di una recrudescenza di virus RS [12], è lecito domandarsi

se la scarsa preponderanza di questo virus da noi rilevata sia stata determinata dalla insensibilità dei sistemi cellulari utilizzati. È infatti noto che le cellule HEP-2, che rappresentano uno dei sistemi cellulari d'elezione per l'isolamento del virus RS, a volte possono risultare scarsamente sensibili all'infezione di questo agente virale [13]. Tuttavia, come è evidente dai risultati presentati nella Tab. 4, noi abbiamo utilizzato più sistemi cellulari, uno dei quali si è rivelato anche più idoneo delle cellule HEP-2 per l'isolamento del virus RS. L'effetto citopatico prodotto da questo virus su fibroblasti diploidi umani è stato nettamente evidente ed analogo a quello riportato in studi effettuati precedentemente in altri laboratori [14]. Inoltre la scarsa frequenza relativa di isolamento di virus RS non può essere attribuita all'inattivazione di questo virus, poichè, a partire dal gennaio 1979 le indagini virologiche qui descritte sono state condotte in parallelo all'Istituto Superiore di Sanità ed all'Istituto di Patologia Generale di Napoli, dove il tempo intercorrente tra il prelievo del materiale (tampone faringeo o autopsia polmonare) e inoculo delle colture cellulari è stato brevissimo (dell'ordine di qualche ora). D'altra parte l'idoneità delle metodiche adoperate è testimoniata dall'alta percentuale complessiva di isolamenti effettuati, ed in particolare dal materiale autoptico polmonare, soprattutto se confrontata con la percentuale di isolamenti virali che si ottengono normalmente a partire da tale materiale.

Dai dati riportati e sulla base di quanto detto sopra sembra pertanto lecito escludere che un unico agente virale sia stato responsabile delle affezioni respiratorie culminate nei decessi riscontrati nel comune e nella provincia di Napoli nel periodo autunno-inverno 1978-1979. Questa conclusione è in accordo con l'osservazione della pluralità degli agenti respiratori riscontrata nei reparti pediatrici di alcuni ospedali cittadini nel periodo invernale dello stesso anno.

Una pluralità di agenti virali responsabili di affezioni respiratorie acute nella popolazione infantile italiana si rileva anche dai dati disponibili in letteratura, basati sia sull'isolamento virale sia su dati sierologici [15-18]. Una preponderanza del virus RS si riscontra principalmente nei bambini al disotto dei sei mesi nelle broncopneumopatie, specialmente bronchioliti, con una variazione nei diversi anni. Va però rilevato che queste casistiche non fanno riferimento in genere a episodi di mortalità; in particolare si può citare uno studio condotto su un campione di popolazione infantile in Umbria nei primi mesi del 1979, contemporaneo all'episodio oggetto di questo studio, che ha evidenziato una incidenza particolarmente elevata di infezioni da virus RS in casi di broncopneumopatie, ma in cui non si sono verificati casi mortali, nonostante la presenza di forme gravi, specie nei soggetti della prima infanzia [19].

Allo scopo di accertare meglio i rapporti tra isolamento virale e causa di morte sarebbe necessario effettuare uno studio più approfondito per stabilire una più stretta correlazione tra aspetti anatomo-patologici e istologici del polmone (principale organo in cui si sono riscontrate alterazioni di rilievo nei bambini deceduti [2], e tipi di virus isolati. Allo stato attuale, mentre gli isolamenti virali effettuati (soprattutto dal materiale autoptico polmonare) possono costituire l'indicazione di un sicuro momento eziologico iniziale delle sindromi respiratorie acute verificatesi a Napoli, l'evento morte deve considerarsi ancora per buona parte difficilmente interpretabile, anche se è possibile che altri fattori patogenetici abbiano avuto un ruolo importante nel determinarlo, quale ad esempio un deficit immunitario, come suggerito dalle ricerche condotte su alcuni dei bambini oggetto di questo studio [20].

#### BIBLIOGRAFIA

1. DONELLI, G., ARANCIA, G., CAIAZZA, S., CHessa, E., MANCINI, P., NOTARGIACOMO, S., ROSATI, F., TANGUCCI, F., & TRAVALUSCI, P. Indagini al microscopio elettronico su campioni relativi a 26 soggetti in età pediatrica deceduti per affezioni respiratorie acute. *Annali Istituto Superiore di Sanità* 17: 783-788.
2. VECCHIONE, R., D'ARMIENTO, M., D'ARMIENTO, F.P. & CALIÒ, A. 1981. Osservazioni istopatologiche relative a 57 soggetti in età pediatrica deceduti per affezioni respiratorie acute. *Ann. Ist. Super. Sanità* 17: 761-776.
3. CHANOCK, R. M., KIM, H. W., BRANDT, C. & PARROTT, P. H. 1976. Respiratory syncytial virus. In: *Viral Infections of Humans*, A. S. Evans (Ed.) pp. 365-382, John Wiley & Sons, New York.
4. PEREIRA, H. G. & KELLEY, B. 1957. Studies on natural and experimental infections by adenoviruses. *Proc. Roy. Soc. Med.* 50: 755-757.
5. CHANY, C., LAPINE, P., LELONG, M., VINH, L. T., SATYE, P. & VIRAT, J. 1958. Severe and fatal pneumonia in infants and young children associated with adenovirus infections. *Am. J. Hyg.* 67: 367-378.
6. HILLEMANN, M. R., HAMPARIAN, V. V., KETLER, A., REILLY, C. M., MC CLELLAND, L., CORNFELD, D. & STOKES, J. 1962. Acute respiratory illnesses among children and adults. *J. Am., Med. Ass.* 180: 445-453.
7. TYRRELL, D. 1979. Respiratory viruses. Some recent advances. In: *Virus Diseases* R. B. Heath (Ed.) pp. 3-7, Pitman Medical, England.
8. DOUGLAS, R. G. 1979. Viral respiratory illnesses: the role of diagnostic virology. In: *Diagnosis of Viral Infections. The Role of the Clinical Laboratory*. D. A. Lennette, S. Specter & K. D. Thompson (Eds.) pp. 215-228, University Park Press, Baltimore.
9. GLEZEN, W. P., FERNALD, G. W. & LOHR, J. A. 1975. Acute respiratory disease of university students with special reference to the etiologic role of *herpes virus hominis*. *Am. J. Epid.* 101: 111-121.

10. HERRMANN, E. C. & HERRMANN, J. A. 1976. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: *Viral Infections, a Clinical Approach*. W. L. Drew (Ed.) pp. 23-45. F.A. Davis Company, Philadelphia.
11. JAWETZ, E., MELNICK, J. L. & ADELBERG, E. A. 1978. *Review of Medical Microbiology*, 13<sup>th</sup> edition, p. 424. Lange Medical Publications, Los Altos, California.
12. HALL, C. B. & DOUGLAS, R. G. Jr. 1976. Respiratory syncytial virus and influenza: practical community surveillance. *Arch. Am. J. Dis. Child.* **130**: 615-620. P. E.
13. PARROTT, R. H., KIM, H. W., BRANDT, C. D., BEEM, M. O., RICHARDSON, L., GERIN, J. L. & CHANOCK, R. M. 1979. Respiratory Syncytial Virus. In: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5<sup>th</sup> edition, E. H. Lennette e N. J. Schmidt (Eds.) pp. 695-708, American Public Health Association, Washington.
14. SMITH, T. F. 1974. Description of viral cytopathic effects and identification of viruses. In: *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology* J. A. Washington (Ed.) pp. 254-277. Little, Brown & Co., Boston.
15. ROCCHI, G., ARANGIO-RUIZ, G., GIANNINI, V., MINUTI, R. & ARCHETTI, J. 1972. Virological studies on acute respiratory infections in childhood. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **219**: 7-13.
16. ANDREONI, G., GIANNINI, V. & ROCCHI, G. 1974. Indagini virologiche in affezioni respiratorie acute osservate a Roma tra il 1965 e il 1971. *Giorn. Mal. Inf. Parass.* **26**: 879-884.
17. MIDULLA, M., ASSENZIO, A. M., BALDUCCI, L., FINOCCHIARO, M., CHICCA, A. & VANNI, O. 1979. Etiologia da virus nelle infezioni respiratorie acute dei bambini. Dati su 1753 casi studiati nell'area di Roma dal 1963 al 1978. *Giorn. Mal. Inf. Parass.* **31**: 560-568.
18. STAGNI, G. & DE ROSA, F. 1979. Indagini virologiche su casi di infezioni acute respiratorie nell'ultimo decennio in Umbria. *Giorn. Mal. Inf. Parass.* **31**: 231-236.
19. PAOLUZZI, S., DE ROSA, F. & STAGNI, G. 1979. L'epidemia di infezioni respiratorie dell'inverno 1979 in Umbria. *Ann. Med. Perugia*, **70**: 1-7.
20. AIUTI, F., D'AURELIO, R., PALMISANO, L., VALESINI, G., LUZI, G. & GIUNCHI, G. 1980. IgA deficiency and circulating immune complexes in neapolitan children with fatal acute respiratory infections. *Lancet*, **i**: 226-229.



Fig. 3. — Effetto citopatico da virus RS in cellule HEP-2.

la "S."

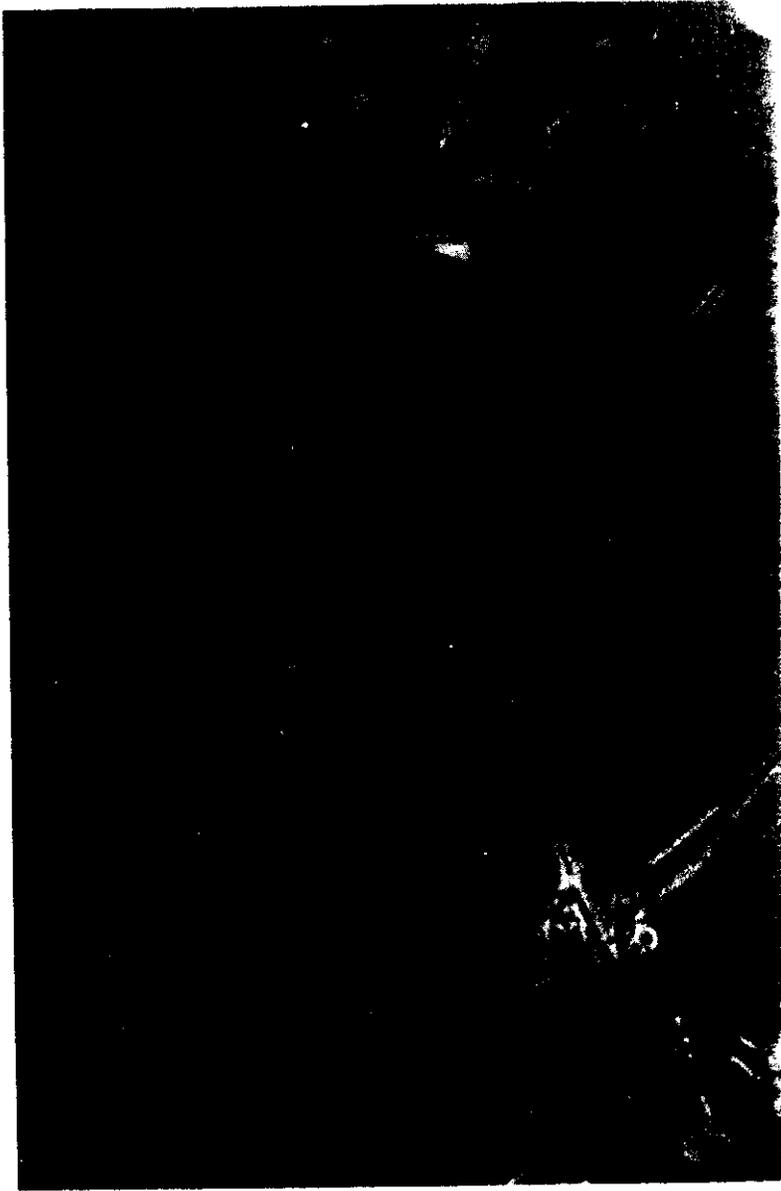


Fig. 4.

Fig. 4. - Effetto citopatico da virus RS in fibroblasti diploidi umani.

## Le infezioni respiratorie virali in età pediatrica

G. DONELLI (a) e W. B. BAINE (b) (\*)

(a) *Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia*

(b) *Epidemiology Program Office, Centers for Disease Control, Public Health Service,  
Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia, U.S.A.*

Le infezioni virali delle basse e alte vie respiratorie rappresentano in tutto il mondo una importante causa di morbidità e mortalità. Nei Paesi industrializzati, ove le malattie respiratorie virali costituiscono per la popolazione in genere e per quella infantile in particolare il problema maggiore di tutta la patologia infettiva, la loro anomala persistenza rispetto ad altre forme infettive da tempo sotto controllo è indice delle difficoltà tuttora esistenti in materia di prevenzione, diagnosi e trattamento. Obiettivo di questa rassegna è appunto quello di riassumere i principali elementi conoscitivi oggi disponibili e di indicare tentativamente alcuni temi di ricerca che sembrano dover meritare ulteriore attenzione in futuro.

Tra i virus a DNA, gli adenovirus vengono considerati i più comuni agenti eziologici di affezioni respiratorie nell'uomo; oltre ad infezioni croniche o latenti dei tessuti linfoidi essi sono infatti capaci di produrre infezioni litiche delle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio. Le sindromi cliniche ad essi associate comprendono raffreddore, faringite, croup, bronchiolite e polmonite. Studi epidemiologici indicano che nell'infanzia solo il 50 % delle infezioni da adenovirus provocano una malattia clinicamente manifesta, anche se nei casi di infezione faringea si hanno tassi più elevati che possono giungere fino al 70 % [1]. In soggetti di età inferiore ai 5 anni tali virus sono stati riconosciuti quali agenti eziologici di affezioni respiratorie acute nel 5 % dei casi, frequenza che aumentava fino al 7 % in popolazioni infantili ospedalizzate [2-4]. Dei 35 sierotipi isolati dall'uomo, classificabili in quattro diversi gruppi di emoagglutinazione, risultano in prevalenza associati alle infezioni polmonari del bambino i tipi 3,7 e 21 [5-8], ripetutamente individuati anche quali responsabili di episodi epidemici

---

(\*) Ospite del Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'Istituto Superiore di Sanità dal luglio 1979 al giugno 1981.

registrati negli ultimi anni in diversi Paesi [9-11]. I tassi di letalità, calcolati in occasioni epidemiche che hanno interessato in forma particolarmente grave gruppi di popolazione infantile, risultano solitamente dell'ordine del 7-10 % [12]. È da notare tuttavia come non sia sempre agevole valutare, sulla base dei dati riportati, quali siano stati i ruoli giocati di volta in volta dai diversi tipi virali, sia per alcune persistenti difficoltà di tipizzazione sia per la eventuale concomitanza di fattori che possono influenzare anche drasticamente il decorso clinico della malattia. Basterà ricordare a tale riguardo i casi di infezioni respiratorie acute ad esito letale, da adenovirus dei tipi 34 e 35 (non noti in precedenza come agenti eziologici), osservati recentemente in soggetti sottoposti a trattamenti terapeutici immunosoppressivi [13-14]; o ancora il riconoscimento, quali agenti causali di morte in bambini di pochi mesi, dei tipi 2 e 22 mai associati in precedenza a forme respiratorie gravi [15-16]. Per quanto concerne poi le difficoltà di sierotipizzazione presentate da alcune varianti antigeniche per le quali l'applicazione delle tecniche di neutralizzazione e di inibizione dell'emoagglutinazione fornisce risposte discordanti, queste appaiono ancora irrisolte e meritano certo rapida attenzione. In una recente comunicazione, ad esempio, ricercatori dei CDC e della Vanderbilt University hanno descritto dieci casi di infezione da adenovirus, con coinvolgimento delle basse e alte vie respiratorie, in soggetti (sette maschi e tre femmine) di età compresa tra 5 mesi e 39 anni: mentre mediante siero-neutralizzazione tutti i virus isolati risultavano appartenere al tipo 21, con le prove di inibizione dell'emoagglutinazione con antisieri di riferimento di coniglio e di cavallo gli stessi virus venivano attribuiti ai tipi 21, 34 e 35. Viceversa, gli antisieri di coniglio relativi ai ceppi isolati dai pazienti avevano titoli elevati di anticorpi neutralizzanti il tipo 21 ed elevati titoli di anticorpi inibenti l'emoagglutinazione rispondenti ai tipi 21 e 35 [17].

Sotto il profilo della prevenzione, la maggior parte dello sforzo di ricerca è stata rivolta allo sviluppo di vaccini capaci di ridurre l'incidenza delle affezioni respiratorie acute da adenovirus. I tentativi in tale direzione sono stati resi assai difficoltosi sia dal riconoscimento degli adenovirus quali agenti oncogeni in diverse specie animali, sia dalla scoperta della loro capacità di formare ibridi di elevata oncogenicità con virus della scimmia SV40. Indagini retrospettive hanno in effetti dimostrato, come vaccini sperimentali usati in passato per prove sul campo fossero talvolta contaminati da tali ibridi. Un vaccino per i sierotipi 4 e 7 è attualmente di uso corrente per l'immunizzazione delle reclute [18] negli Stati Uniti, ove viene impiegato con discreto successo.

Per quanto attiene al discusso ruolo eziologico dei virus erpetici nelle affezioni respiratorie, questo è stato dimostrato attraverso uno studio epidemiologico della durata di 6 anni che ha interessato una vasta popolazione

di studenti: nell'11,5 % dei casi una infezione da *Herpes simplex 1* è stata associata a tonsillite e faringite [19]. È inoltre ben noto che, in soggetti immunodepressi, l'infezione da virus erpetici può interessare anche le basse vie respiratorie con esito spesso letale, come dimostrano i casi di polmonite frequentemente riportati in letteratura relativamente ad individui con compromissioni del sistema immunitario successive a trapianti d'organo [20-21], ustioni gravi [22] o infezioni multiple [23].

Tra i virus a RNA, agenti eziologici di affezioni respiratorie acute in soggetti non immunodepressi sono compresi nei gruppi dei picornavirus, dei coronavirus e degli orto e paramixovirus.

L'elenco dei picornavirus responsabili di infezioni dell'apparato respiratorio comprende diversi enterovirus, oltre ovviamente i rinovirus. Con un periodo di incubazione che varia da 2 a 35 giorni, gli enterovirus sono noti per la loro alta infettività: comune è la loro diffusione intrafamiliare con un tasso di attacco che nei bambini raggiunge il 50 %. L'infezione è seguita da una fase viremica che precede di molti giorni l'inizio dei sintomi nel caso di malattia apparente; sia nelle manifestazioni cliniche che subcliniche si ha comunque la permanenza dei virus nel faringe per 10-15 giorni ed il loro rilascio con le feci per alcune settimane dopo l'infezione. La definizione del ruolo eziologico degli enterovirus nelle affezioni respiratorie acute è stata ostacolata, come nel caso di altre sindromi enterovirali, sia dalla necessità di ricorrere al topino per l'isolamento primario della maggior parte dei tipi virali, sia dal numero degli immunotipi, tanto elevato da rendere pressoché impraticabile, in assenza di un isolamento virale, una diagnosi eziologica su base serologica. Le manifestazioni più comuni di una affezione respiratoria da enterovirus sono tosse, faringite e rinite in associazione varia con uno stato febbrile; sindromi assai più gravi e diversificate, con compromissione non solo polmonare ma anche di altri organi e sistemi (SNC, cuore, ecc.) sono state talvolta osservate soprattutto in neonati [24-27]. Particolarmente ben studiato è stato il ruolo dei virus coxsackie ed echo nella patologia respiratoria [28]: numerosi sono i casi descritti in letteratura di affezioni respiratorie acute sostenute da virus coxsackie di gruppo A (specie dei tipi 9, 16, 21 e 24) e B (specie dei tipi 3, 4 e 5). Nei bambini in particolare, virus coxsackie di gruppo B sono stati associati sia a casi di croup che di infezione delle basse vie respiratorie, mentre virus echo, specie di tipo 11, sono stati osservati sia in infezioni delle vie aeree superiori che ancora in casi di croup [29].

Da soggetti in età infantile, ricoverati per bronchiolite e polmonite, è stato inoltre isolato l'enterovirus 69, uno degli enterovirus di più recente descrizione [30]. In alcuni recenti casi di SIDS (Sudden Infant Death Syndrome) sono stati infine isolati virus echo dei tipi 7 e 11 da parenchima polmonare [31].

I rinovirus, con oltre 100 immunotipi noti nell'uomo, rappresentano i più importanti agenti eziologici del comune raffreddore. Il notevole numero di immunotipi, le loro reazioni eterotipiche nei tests di fissazione del complemento, l'incapacità della maggior parte dei ceppi di provocare emagglutinazione ed i bassi livelli di anticorpi neutralizzanti nel siero, concorrono tuttavia a rendere l'approccio sierodiagnostico sostanzialmente inapplicabile alle infezioni naturali da rinovirus [32]. Nonostante la loro importanza nell'epidemiologia della rinite, i rinovirus sono del tutto insignificanti quali patogeni delle basse vie respiratorie. Una buona spiegazione sembrerebbe essere fornita dal fatto che la temperatura ottimale per la replicazione dei rinovirus cade nell'intervallo 33-35 °C; temperature pari o superiori a 37 °C esercitano un effetto di inibizione sulla replicazione di questi virus ed ostacolerebbero quindi lo sviluppo di infezioni polmonari e l'instaurarsi di una fase viremica. Nei climi temperati le infezioni da rinovirus mostrano la massima incidenza nel periodo autunnale per ricomparire poi in primavera in minore entità. Lo studio della distribuzione dei casi per immunotipo rivela una graduale tendenza alla sostituzione nel tempo degli immunotipi circolanti in una determinata area geografica con altri ceppi.

Tipicamente apiretiche, le infezioni da rinovirus producono congestione nasale, starnuti e rinorrea, frequentemente accompagnati da cefalea, faringite e meno comunemente da tosse e raucedine. Tra le complicanze vanno annoverate la sinusite e l'otite media, spesso in concomitanza con una infezione secondaria da batteri patogeni. Si pensa che la più importante via di trasmissione sia rappresentata dal contatto tra le mani di persone infette e non, con successiva inoculazione delle mucose nasali o congiuntivali. Come per altre malattie da virus, le scuole agiscono da importanti centri di diffusione dell'infezione e gli scolari fungono spesso da portatori nelle famiglie, con una alta incidenza di casi secondari intrafamiliari [33].

Vaccini sperimentali hanno mostrato una buona capacità nel ridurre il tasso di attacco delle forme sintomatiche nelle infezioni da rinovirus ed induttori topici di interferon potrebbero avere anch'essi analoga efficacia: resta quindi il solo problema della valutazione, in termini di sanità pubblica della priorità che andrà assegnata a questi possibili strumenti di immunizzazione e chemioprolifassi.

La comprensione del ruolo giocato dai coronavirus quali agenti eziologici di affezioni respiratorie acute è stata ritardata, più che per qualsiasi altro agente virale, dalle limitazioni imposte dalle tecniche virologiche correntemente disponibili. Si tratta innanzitutto di virus il cui isolamento da campioni clinici risulta particolarmente difficoltoso. Dal punto di vista serologico, l'impiego delle tecniche disponibili, tra l'altro non ancora applicate a tutti i ceppi noti, è poi complicato dall'esistenza di com-

plesse reazioni antigeniche crociate tra coronavirus diversi. Nonostante tali limiti metodologici, diversi aspetti del ruolo giocato da questi virus nella patologia respiratoria umana cominciano a delinearsi con una certa chiarezza [34]. I sintomi con i quali la malattia si manifesta di solito nell'adulto sono quelli di un comune raffreddore, cui si accompagna la febbre in una minoranza apprezzabile di casi [35]. Studi sieroepidemiologici relativi ad una popolazione infantile hanno indicato, in associazione con infezioni da coronavirus OC43, la seguente sintomatologia: mal di gola e tosse nel 30 % dei casi, faringite nel 72 %, febbre ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) nel 40 % e rantoli o congestione polmonare nel 5 % [36]. Le infezioni da coronavirus possono comunque interessare anche le basse vie respiratorie, come dimostrano i casi di polmonite osservati tra le reclute militari [37] e di affezioni acute in bambini [38]. Si ha tuttavia la consapevolezza di essere ancora ben lontani dall'aver definito l'effettiva rilevanza eziologica di questi virus: una elevata priorità dovrà essere quindi assegnata a tutte quelle ricerche che possano portare allo sviluppo di nuovi metodi diagnostici, ricerche di cui è un eccellente esempio la recente messa a punto del test di emoagglutinazione per immunoaderenza che permette una rapida e accurata determinazione di anticorpi per coronavirus 229E [39].

Gli ortomixovirus comprendono i virus influenzali che si differenziano, per le loro ribonucleoproteine antigenicamente diverse, nei tipi A, B e C, tutti e tre noti quali agenti causali di infezioni respiratorie. Mentre tuttavia il tipo C è solo sporadicamente associato ad affezioni delle alte vie respiratorie, gli altri due tipi giocano ambedue importanti e abbastanza ben definiti ruoli nelle forme respiratorie acute sia dell'adulto che del bambino. Il carattere non pandemico della malattia associata all'infezione da virus influenzale di tipo B ha tuttavia indotto a dirottare sull'influenza A la maggior parte degli sforzi di ricerca e spesso a trascurare ingiustificatamente il peso dell'influenza B [40].

Studi recenti dimostrano la variabilità, in funzione dell'età, del quadro clinico dell'influenza B: nel neonato si osserva febbre elevata accompagnata da sintomatologia respiratoria, talvolta complicata da otite media, mentre nel bambino e nell'adulto prevalgono disturbi gastrointestinali e sistemici [41].

Va inoltre ricordato come il virus di tipo B sia stato ripetutamente associato a casi di sindrome di Reye osservati nel corso di epidemie influenzali prevalentemente circoscritte all'età infantile [42-44].

Tra le infezioni respiratorie di natura virale che colpiscono l'uomo, l'influenza di tipo A è al tempo stesso la più studiata e la più imprevedibile perlomeno sotto l'aspetto epidemiologico. Per comprendere l'essenza di tale imprevedibilità basta ricordare pochi dati fondamentali circa la struttura molecolare dei virus influenzali: il loro genoma, costituito da

RNA segmentato, che facilita la ricombinazione genetica nell'ambito della progenie virale risultante da infezioni miste, dovute a ceppi diversi appartenenti allo stesso tipo; i due diversi peplomeri glicoproteici, ad attività rispettivamente emoagglutinante e neuroaminidasi, le cui caratteristiche antigeniche determinano i vari sottotipi del virus influenzale di tipo A. Il rapporto tra caratteristiche strutturali e profilo epidemiologico delle infezioni è individuabile nelle seguenti osservazioni:

1) gli anticorpi per l'emoagglutinina e la neuroaminidasi di un dato ceppo risultano protettivi nei riguardi di infezioni dovute ad un ceppo omologo o a ceppi strettamente correlati dello stesso sottotipo [45-46], mentre non conferiscono alcuna protezione nei riguardi di infezioni da ceppi di sottotipi eterologhi;

2) le maggiori pandemie di influenza A si sono finora susseguite ad intervalli di più di dieci anni, con periodi interpandemici caratterizzati ogni pochi anni da limitati fenomeni epidemici: ogni singola pandemia o epidemia ha comunque registrato finora, ovunque avvenuta nel mondo, la prevalenza di ceppi appartenenti allo stesso sottotipo;

3) le caratteristiche antigeniche dei ceppi prevalenti nell'ambito di un determinato sottotipo si modificano gradualmente, nel corso degli anni, secondo un processo noto come deriva antigenica;

4) in contrasto con questo fenomeno di graduale modificazione antigenica, ad intervalli di molti anni i sottotipi esistenti vengono all'improvviso soppiantati da nuovi sottotipi;

5) evidenze serologiche indicano che, almeno per quanto riguarda l'antigene emoagglutinina, queste più importanti modifiche antigeniche non sono avvenute a caso ma secondo un modello ciclico basato su un numero finito di possibilità.

Le caratteristiche dei virus influenzali di tipo A qui succintamente riassunte indicano con chiarezza, quale obiettivo prioritario di questi anni, la messa a punto di metodi migliori e più rapidi di quelli attualmente disponibili per saggiare la capacità di nuovi ceppi virali di diffondersi tra la popolazione e di causare infezioni gravi. Un saggio di laboratorio per la valutazione del grado di virulenza di ceppi diversi di influenza A è stato recentemente descritto da ricercatori statunitensi [47]: esso è basato sul monitoraggio, in colture di anelli tracheali di furetto infettate con i ceppi virali da saggiare, della replicazione virale e dell'attività ciliare delle cellule epiteliali della trachea. Gli autori affermano di aver osservato una rapida riduzione relativa dell'attività ciliare nel caso di due ceppi virali associati ad eccesso di mortalità, mentre non si è riscontrato un effetto para-

gonabile saggiando tre ceppi non associati ad eccessiva mortalità. Ove fosse dimostrata l'estendibilità del test e confermata ulteriormente la sua sensibilità, esso potrebbe rappresentare un buon mezzo di rapida valutazione del prevedibile impatto di nuovi ceppi virali, oltretutto fornire un interessante strumento per una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia influenzale.

Dal punto di vista clinico, uno dei maggiori problemi che si presenta durante una epidemia influenzale è rappresentato dall'insorgenza in molti casi di infezioni batteriche secondarie. Tra i meccanismi patogenetici che favoriscono l'insorgere di polmoniti post-influenzali da *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ed *Haemophilus influenzae* sono stati da tempo chiamati in causa i danni causati dall'infezione virale all'epitelio respiratorio e l'interferenza con la funzione dei macrofagi a livello alveolare: negli ultimi anni vi è stata crescente attenzione per un possibile meccanismo addizionale che vedrebbe l'aderenza batterica come fattore determinante per l'avvio del processo infettivo. In pazienti con infezioni respiratorie acute a presunta eziologia virale, ed in soggetti vaccinati sperimentalmente con vaccino vivo attenuato per l'influenza A/USSR/77(H1N1), è stata proprio di recente osservata una aumentata aderenza alle cellule epiteliali del faringe rispettivamente di *S. aureus*, di *S. pneumoniae* tipo I ed *H. influenzae* [48].

Sul piano preventivo, l'efficacia dell'uso di vaccini influenzali inattivati risulta tuttora limitata per tre ordini di problemi. Innanzitutto, poiché non è facile ottenere soddisfacenti risposte anticorpali nemmeno per un solo ceppo di un dato sottotipo senza ricorrere alla somministrazione di dosi di antigene eccessivamente reattogene, ancor meno fattibile è la vaccinazione contro tutti i sottotipi noti, anche ammesso di non voler prendere in considerazione le differenze antigeniche esistenti tra i diversi ceppi di ogni sottotipo. In secondo luogo i tempi richiesti per la realizzazione, la produzione e la distribuzione di un vaccino contro un ceppo influenzale di nuovo isolamento sono oggi solitamente tali da non consentire l'impiego del nuovo vaccino prima della stagione successiva a quella in cui è comparso il nuovo ceppo, cioè quando si sarà ormai registrata gran parte della morbilità e mortalità ad esso associate. Infine va tenuto conto che le più gravi epidemie influenzali sono avvenute in anni in cui è comparso un sottotipo del tutto nuovo, contro il quale sono risultati del tutto inutili i vaccini di volta in volta disponibili, in quanto diretti contro i sottotipi prevalenti nelle annate precedenti. Va tra l'altro ricordato come un piano di vaccinazione di massa attivato negli Stati Uniti per l'influenza suina sia stato interrotto in seguito alla dimostrazione, ottenuta attraverso un apposito programma di sorveglianza degli effetti collaterali, di una associazione tra vaccinazione e casi con sindrome di Guillain-Barré.

Particolare attenzione è stata rivolta negli ultimi anni allo sviluppo di vaccini vivi attenuati per l'influenza A basati sull'utilizzazione di mutanti temperatura-sensibili che, incapaci di replicarsi a temperatura corporea, indurrebbero la produzione a livello nasale di anticorpi secretivi; dati interessanti sul livello di protezione conferito da questo tipo di vaccini, anche in confronto a corrispondenti vaccini del tipo inattivato, sono stati oggetto di recenti pubblicazioni [49-50]. L'entusiasmo iniziale per tale nuovo tipo di vaccino è stato tuttavia attenuato sia dalla consapevolezza dei rischi associati alla possibile incorporazione di materiale genetico virale nel genoma delle cellule ospiti, sia dai risultati di un recente studio longitudinale effettuato su una popolazione infantile che ha mostrato il trascurabile grado di immunizzazione conferito dalle stesse infezioni naturali da virus influenzali di tipo A nei riguardi di ceppi virali omologhi o ad essi strettamente correlati [51].

Risultati incoraggianti sono stati ottenuti recentemente nella terapia dell'influenza acuta mediante trattamento con amantidina, sia per aerosol che per somministrazione orale; mentre nel primo caso tuttavia si sono osservati solo lievi effetti collaterali locali [52], nell'altro uno studio controllato a doppio cieco ha mostrato un aumento significativo, tra i soggetti trattati, di disturbi quali insonnia, stato di agitazione e vertigini [53]. È stato inoltre appena descritto un metodo rapido ed efficiente per saggiare *in vitro* l'attività di sostanze antivirali nei riguardi dei virus influenzali di tipo A e B [54].

Tra gli altri numerosi problemi di ricerca tuttora aperti nel campo dei virus influenzali, meritano infine di essere ricordati quelli relativi alla individuazione dei « serbatoi naturali » di questi virus nei periodi interepidemici, alla valutazione dei ruoli giocati rispettivamente dalle mutazioni e dalle ricombinazioni nel determinismo dei nuovi ceppi e sottotipi ed alla definizione del contributo dei virus influenzali degli animali domestici e selvatici alla composizione genetica dei virus influenzali umani.

Tra i paramixovirus, i virus parainflenzali ed il virus respiratorio sinciziale rappresentano importanti agenti eziologici di infezioni respiratorie per la popolazione in genere, ma per quella infantile in particolare.

Per quanto concerne i virus parainflenzali ne sono noti quattro sierotipi, ciascuno dei quali è associato ad infezioni ben differenziabili sia sotto il profilo epidemiologico che clinico. Una caratteristica peculiare è la frequenza di reinfezioni cui dà luogo ciascun sierotipo. Nei neonati le infezioni dovute ai sierotipi 1 e 2 non comportano alcuna conseguenza fintanto che gli anticorpi materni sono presenti a livelli apprezzabili; la suscettibilità all'infezione che si instaura al calare dei relativi titoli anticorpali può dar luogo a modeste affezioni delle alte vie respiratorie e, solo

nei casi più gravi, a croup. Studi epidemiologici condotti in Inghilterra e negli Stati Uniti, indicano la tendenza di tali infezioni a manifestarsi in forma di focolai epidemici durante i mesi autunnali e invernali, con una prevalenza del sierotipo 1 negli anni pari e del sierotipo 2 in quelli dispari: tale fenomeno di interferenza può di volta in volta operare fino ad escludere del tutto la trasmissione di uno dei due sierotipi. Gli anticorpi materni passivamente acquisiti non proteggono invece il neonato dalle infezioni parainfluenzali di tipo 3; studi epidemiologici su popolazioni infantili ospedalizzate hanno anzi dimostrato come tale agente risulti secondo al solo virus respiratorio sinciziale quale causa di bronchiolite e polmonite nei primi mesi di vita [55-57]. Al tipo 4 sono infine associate affezioni delle alte vie respiratorie di lieve entità [58].

Nonostante la rilevanza di tali infezioni nella patologia respiratoria acuta della prima infanzia e l'esistenza di tre soli sierotipi clinicamente importanti, scarsi passi in avanti sono stati finora fatti per prevenire la morbilità e la mortalità associate a questi agenti virali. Come era prevedibile data la facilità di reinfezione tipica di questi virus, i vaccini sperimentali inattivati, capaci di indurre solo anticorpi circolanti, hanno fornito risultati insoddisfacenti; la direzione giusta per le ricerche in questo campo sembra quindi essere, di nuovo, quella della realizzazione di vaccini vivi attenuati in grado di evocare una sufficiente risposta anticorpale secretoria a livello nasale.

Fin dal suo primo isolamento nell'uomo avvenuto circa 25 anni fa [58-59], il virus respiratorio sinciziale si è subito dimostrato il più importante agente eziologico delle affezioni respiratorie dell'età infantile.

Viene oggi comunemente accettato che praticamente tutti i bambini subiscono entro i primissimi anni di vita perlomeno una infezione dovuta a questo virus, la cui epidemiologia è caratterizzata da frequenti reinfezioni [60].

Il virus respiratorio sinciziale, oltre ad affezioni delle alte vie respiratorie e a tracheobronchiti, viene associato con maggior frequenza alle bronchioliti ed alle polmoniti dei primi mesi di vita; studi epidemiologici di qualche anno fa ne riportano l'isolamento dal 27 % di piccoli pazienti ricoverati con diagnosi clinica di bronchiolite, dal 9 % di quelli ricoverati con polmonite, dall'8 % di non ricoverati ma affetti da malattia respiratoria acuta e soltanto dallo 0,3 % di soggetti di controllo [61]. La presenza di anticorpi neutralizzanti, presumibilmente di origine materna, nel siero di tutti i soggetti studiati nell'ambito di una vasta casistica di neonati colpiti da bronchiolite o polmonite da virus RS durante i primi tre mesi di vita [62], congiuntamente all'osservata maggiore gravità dell'infezione da questo virus nei neonati [63], suggeriscono un possibile ruolo del sistema immunitario nella patogenesi della malattia respiratoria.

Dal punto di vista epidemiologico, il virus respiratorio sinciziale, diversamente dagli altri virus respiratori che causano epidemie ad intervalli irregolari o mostrano un quadro misto endemico-epidemico, è il solo che provoca epidemie annuali, con punte di incidenza invernali o primaverili talvolta molto elevate; nei grandi centri urbani [61-62] con un rischio di ospedalizzazione del 4 ‰ in bambini al di sotto di un anno e con un rischio ancor più elevato in aree industrializzate ad alta densità di popolazione infantile e con alto indice di affollamento delle abitazioni [64]. I risultati di vari studi epidemiologici sembrano inoltre indicare una maggiore suscettibilità all'infezione dei maschi rispetto alle femmine e dei soggetti alimentati artificialmente rispetto a quelli allattati al seno [65]; tipica è ancora l'apparente scomparsa di alcuni agenti respiratori virali che sembra accompagnare l'insorgenza di un focolaio epidemico da virus RS in una comunità [66-67].

Negli ultimi anni è stato inoltre sottolineato il ruolo del virus respiratorio sinciziale quale importante patogeno nosocomiale, analizzando sia i probabili modi di trasmissione dell'infezione da parte del personale sanitario [68], sia i tempi di sopravvivenza dei virus ai diversi possibili livelli di contaminazione ambientale intraospedaliera [69].

Per quanto riguarda l'aspetto sierodiagnostico, la fissazione del complemento non permette di distinguere che un solo tipo antigenico di virus RS; ceppi diversi sono stati tuttavia identificati recentemente mediante siero-neutralizzazione utilizzando antisieri animali iperimmuni [70].

In tema di chemioterapia specifica meritano una segnalazione le ricerche condotte recentemente con la ribavirina, che ha mostrato buona capacità di inibizione della crescita virale in coltura di cellule [71].

Un notevole sforzo di ricerca è stato inoltre compiuto negli ultimi quindici anni per giungere alla realizzazione di un vaccino capace di prevenire le forme più gravi di infezione da virus RS; purtroppo, nei tentativi finora effettuati con diversi vaccini sperimentali, sia del tipo inattivato che di quello vivo attenuato, questi non si sono rivelati in grado di conferire un sufficiente livello di immunità, quando non hanno addirittura agito aumentando l'incidenza di infezioni naturali gravi tra i soggetti vaccinati, rispetto a quelli di controllo.

A conclusione di questa breve rassegna sulle infezioni respiratorie virali dell'infanzia, meritano un commento talune argomentazioni, ospitate spesso anche da riviste scientifiche di riconosciuto livello, circa la pretesa rilevanza di fattori estrinseci, quali le cattive condizioni socio-economiche, nell'aumento del rischio di grave malattia in bambini infettati da virus RS o da altri patogeni respiratori. Poole e Tobin [72], in un lavoro di qualche anno fa, affermano ad esempio: « Appare evidente che il virus RS è il patogeno più importante dei primi mesi di vita sia nei grandi

agglomerati urbani che nelle altre aree del Paese » (Inghilterra, n. d. A.); i loro dati tuttavia, oltre ad essere limitati ad un periodo di soli due anni e mezzo, non sono tali da poter escludere ruoli significativi di tutta una serie di variabili (« confounding variables ») relative alle differenze esistenti tra grandi concentrazioni urbane, città di medie dimensioni e piccoli centri abitativi, in fatto di distribuzione per età della popolazione, efficienza delle strutture sanitarie in genere e dei laboratori di accertamento diagnostico in particolare [73], criteri di ricovero ospedaliero o meno nella fascia di età più colpita da questa infezione, ecc.

Un altro studio interessante sull'argomento è quello condotto da Clarke e Coll. [74] in dieci aree diverse del territorio inglese, nelle stagioni invernali 1973-1974 e 1974-1975. Secondo questi Autori « In comunità urbane e rurali le probabilità dei bambini di essere ricoverati in ospedale per malattia dovuta a virus RS erano due o tre volte più basse che in aree industriali » (intendendo per « aree industriali » gli agglomerati urbani ad elevato numero di abitanti, n. d. A.); mancano tuttavia indicazioni circa le differenze presumibilmente esistenti tra le tre diverse categorie di aree (rurali, urbane e industriali) per quanto concerne variabili quali l'inquinamento atmosferico, l'abitudine al fumo dei genitori, il numero medio di bambini per famiglia, il tipo di allattamento ricevuto, la frequenza di asilnido e scuole materne, le terapie praticate prima del ricovero ed i criteri seguiti per decidere quest'ultimo, le condizioni di prelievo, trasporto ed analisi dei campioni clinici nonché la possibile presenza nelle varie aree studiate di ceppi virali con diversa patogenicità.

Per quanto riguarda il fattore socio-economico, questi stessi Autori riportano per l'area di Newcastle una incidenza di ricoveri del  $6,58/10^5$  in bambini provenienti dalla classe più elevata, rispetto ad una gamma di incidenze tra il  $38,44$  ed il  $77,85/10^5$  riscontrata in bambini delle successive cinque classi di provenienza, individuate sulla base di altrettanti livelli socio-economici decrescenti; i dati dettagliati relativi a tale studio non sono stati tuttavia riportati nella versione pubblicata del lavoro. Anche in questo caso, comunque, il ruolo della classe socio-economica di appartenenza dei bambini nel rischio di ricovero non può certo ritenersi dimostrato né, a dire il vero, sembra che ne siano convinti gli stessi Autori i quali sentono opportunamente il bisogno di mettere in rilievo la possibilità che altre variabili (differenze nei criteri di ricovero, nella prevalenza di prematuri, nel tipo di allattamento, ecc.) siano alla base delle diversità di incidenza osservate. Dal momento che, come è ben noto, il virus RS richiede particolari cautele per essere isolato, la rilevata minore incidenza di ricoveri per affezioni respiratorie dovute a tale virus, in bambini della classe più elevata, potrebbe rivelarsi ad esempio una pura e semplice espressione della tendenza delle famiglie più agiate a ricoverare prevalentemente

i propri figli in un dato ospedale, per qualche motivo non in grado di prelevare e/o inoltrare in condizioni ottimali i necessari campioni clinici al laboratorio di virologia.

L'appartenenza ad una classe di basso livello socio-economico come fattore di rischio nel caso di infezione da virus RS è stata presa in considerazione anche da alcuni ricercatori statunitensi le cui ipotesi, basate generalmente su confronti tra popolazioni geograficamente distinte e tra situazioni nelle quali non si possono escludere seri vizi di accertamento, appaiono anch'esse ben difficilmente sostenibili.

In definitiva, tenendo conto che gli studi epidemiologici non possono ovviamente non osservare gli stessi rigidi criteri di valutazione comunemente accettati per la verifica di ipotesi in altri campi di ricerca, non sembra che gli elementi scientifici oggi disponibili siano sufficienti per asserire l'esistenza di un maggior rischio di malattia grave da virus RS in bambini provenienti dalle fasce di popolazione più disagiate.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BRANDT, C. D., KIM, H. W., JEFFRIES, B. C., PYLES, G., CHRISTMAS, E. E., REID, J. L., CHANOCK, R. M. & PARROTT, R. H. 1972. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. II. Variation in adenovirus infections by year and season. *Am. J. Epidemiol.* **95**: 218-227.
2. BRANDT, C. D., KIM, H. W., VARGOSKO, A. J., JEFFRIES, B. C., ANOLIO, J. O., RINGE, B., PARROT, R. H., & CHANOCK, R. M. 1969. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am. J. Epidemiol.* **90**: 484-500.
3. HARRIS, D. J., WULFF, H., RAY, C. G., POLAND, J. D., CHIN, T. D. Y. & WERNER H. A. 1971. Viruses and disease. 3. An outbreak of adenovirus type 7A in a children's home. *Am. J. Epidemiol.* **93**: 399-402.
4. FOY, H. M., COONEY, M. K., MCMAHAN, R. & GRAYSTON, J. T. 1973. Viral and mycoplasmal pneumonia in a prepaid medical care group during an eight-year period. *Am. J. Epidemiol.* **97**: 93-102.
5. BECROFT, D. M. O. 1971. Bronchiolitis obliterans, bronchiectasis and other sequelae of adenovirus type 21 infection in young children. *J. Clin. Pathol.* **24**: 72-82.
6. JACKSON, G. G. & MULDOON, R. L. 1973. « Viruses causing common respiratory infections in man ». The University of Chicago Press, 248 p.
7. ERBERT, F. A., WILKINSON, D., BURCHAK, E. & MORGANTE, O. 1977. Adenovirus type 3 pneumonia causing lung damage in childhood. *Can. Med. Assoc. J.* **116**: 274-276.
8. FU-HSI, C., LAN, S., HAO-YAN, C., HSIU-YUN, W., YU-CHIN, S. & KUEI-YING, L. 1977. Direct fluorescent antibody technique in early and rapid diagnosis of adenovirus pneumonia in children. *Chinese Med. J.* **3**: 227-232.

9. LANG, W. R., HOWDEN, C. W., LAWS, J. & BURTON, J. F. 1969. Bronchopneumonia with serious sequelae in children with evidence of adenovirus type 21 infection. *Brit. Med. J.* **1**: 73-79.
10. SIMILA, S., YLIKORKALA, O., & WASZ-HOCKERT, O. 1971. Type 7 adenovirus pneumonia. *J. Pediatr.* **79**: 605-611.
11. BROWN, R. S., NOCRADY, M. B., SPENCE, L. & WINGLESWORTH, F. W. 1973. An outbreak of adenovirus type 7 infection in children in Montreal. *Can. Med. Assoc. J.* **108**: 434-439.
12. WOHL, M. E. B. & CHERNICK, V. 1978. Bronchiolitis. *Am. Rev. Resp. Dis.* **118**: 759-781.
13. KELLER, E. W., RUBIN, R. H., BLACK, P. H., HIRSCH, M. S. & HIERHOLZER, J. C. 1977. Isolation of adenovirus type 34 from a renal transplant recipient with interstitial pneumonia. *Transplantation.* **23**: 188-191.
14. STALDER, H., HIERHOLZER, J. C. & OXMAN, M. N. 1977. New human adenovirus (candidate adenovirus type 35) causing fatal disseminated infection in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **6**: 257-265.
15. ANDIMAN, W. A., JACOBSON, R. I. & TUCKER, G. 1977. Leukocyte-associated viremia with adenovirus type 2 in an infant with lower-respiratory-tract disease. *New Engl. J. Med.* **297**: 100-101.
16. LE TAN VINH, LEBON, P., ROUSSET, MLE & HUAULT, G. 1978. Pneumonie mortelle à adénovirus du nouveau-né. *Ann. Pédiatr.* **25**: 35-39.
17. HIERHOLZER, J. C., TORRENCE, A. E. & WRIGHT, P. F. 1980. Generalized viral illness caused by an intermediate strain of adenovirus (21/H21+35). *J. Infect. Dis.* **141**: 281-288.
18. BAUM S. G. 1979. Adenovirus. In: MANDEL, G. L., DOUGLAS, R. D. & BENNETT, J. E., eds. *Principles and practice of infectious disease*. New York, John Wiley & Sons, 1353-1361.
19. GLEZEN, W. P., FERNALD, G. W. & LOHR, J. A. 1975. Acute respiratory disease of university students with special reference to etiologic role of *herpesvirus hominis*. *Am. J. Epidemiol.* **101**: 111-121.
20. HEROUT, V., VORTEL, V. & VONDRACKOVA, A. 1966. Herpes simplex involvement of the lower respiratory tract. *Am. J. Clin. Pathol.* **46**: 411-419.
21. DOUGLAS, R. G. JR, ANDERSON, M. S., WEG, J. G., WILLIAMS, T., JENKINS, D. E., KNIGHT, V. & BEALL, A. C. JR. 1969. Herpes simplex virus pneumonia. Occurrence in an allotransplanted lung. *J.A.M.A.* **210**: 902-904.
22. NASH, G. & FOLEY, F. D. 1970. Herpetic infection of the middle and lower respiratory tract. *Am. J. Clin. Pathol.* **54**: 857-863.
23. KLIMEK, J. J., LINDENBERG, L. B., COLE S., ELLISON, L. H. & QUINTILIANI, R. 1976. Fatal case of influenza pneumonia with suprainfection by multiple bacteria and herpes simplex virus. *Am. Rev. Resp. Dis.* **113**: 683-688.
24. SANDERS, D. Y. & CRAMBLETT, H. G. 1968. Viral infections in hospitalized neonates. *Am. J. Dis. Child.* **116**: 251-256.
25. HURLEY, R., NORMAN, A. P. & PRYSE-DAVIES, J. 1969. Massive pulmonary haemorrhage in the newborn associated with coxsackie B virus infection. *Brit. Med. J.* **III**: 636-637.

26. OVERALL, J. C. & GLASGOW, L. A. 1970. Virus infections of the fetus and newborn infant. *J. Pediatr.* **77**: 315-333.
27. GEAR, J. & MEASROCH, V. 1973. Coxsackie virus infections of the newborn. *Progr. Med. Virol.* **15**: 42-62.
28. KIBRICK, S. 1964. Current status of Coxsackie and ECHO viruses in human disease. *Progr. Med. Virol.* **6**: 27-70.
29. YOUNG, N. A. 1979. Coxsackievirus and echovirus. In: MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. D. & BENNET, J. E. (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, John Wiley & Sons, 1104-1120.
30. YOUNG, N. A. 1979. Newer enterovirus. In: MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. D. JR. & BENNET, J. E. (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, John Wiley & Sons, 1120-1124.
31. DOWNHAM, M. A. P. S., GARDNER, P. S., MC QUILLIN, J. & FERRIS, J. A. J. 1975. Role of respiratory viruses in childhood mortality. *Brit. Med. J.*, **1**: 235-239.
32. SCHIEBLE, J. H. 1980. Rhinoviruses. In: LENNETTE E. H., BALOWS, A., HAUSLER, W. J. & TRUANT J. P. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 3rd ed. Washington, American Society for Microbiology, 829-835.
33. GWALTNEY, J. M. Jr. 1979. Rhinovirus. In: MANDEL, G. L., DOUGLAS, R. D. JR. & BENNET, J. E. (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, John Wiley & Sons, 1124-1134.
34. MCINTOSH, K. 1979. Coronavirus. In: MANDEL, G. L., DOUGLAS, R. D. JR. & BENNETT, J. E. (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, John Wiley & Sons, 1212-1217.
35. HENDLEY, J. O., FISHBURNE, H. B. & GWALTNEY, J. M. JR. 1972. Coronavirus infections in working adults, eight-year study with 229E and OC43. *Am. Rev. Resp. Dis.* **105**: 805-811.
36. KAYE H. S., MARSH, H. B. & DOWDLE W. R. 1971. Seroepidemiologic survey of coronavirus (strain OC43) related infections in a children's population. *Am. J. Epidemiol.* **94**: 43-49.
37. WENZEL, R. P., HENDLEY, J. O., DAVIES, J. A. & GWALTNEY J. M. JR. 1974. Coronavirus infections in military recruits. Three-year study with coronavirus strains OC43 and 229E. *Am. Rev. Resp. Dis.* **109**: 621-624.
38. MCINTOSH, K., KAPIKIAN, A. Z., TURNER, H. C., HARTLEY, J. W., PARROTT, R. H. & CHANOCK, R. M. 1970. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am. J. Epidemiol.* **91**: 585-592.
39. GERNA, G., ACHILLI, G., CATTANEO, E. & CEREDA, P. 1978. Determination of coronavirus 229E antibody by an immunoadherence hemagglutination method. *J. Med. Virol.* **2**: 215-223.
40. BAINE, W. B., LUBY, J. P. & MARTIN, S. M. 1980. Severe illness with influenza B. *Am. J. Med.* **68**: 181-189.
41. WRIGHT, P. F., BRYANT, J. D. & KARZON, D. T. 1980. Comparison of influenza B/Hong Kong virus infections among infants, children and young adults. *J. Infect. Dis.* **141**: 430-435.
42. GLICK, T. H., LIKOSKI, W. H., LEVITT, L. P., MELLIN, H. & REYNOLDS, D. W. 1970. Reye's syndrome : an epidemiologic approach. *Pediatrics.* **46**: 371-377.

43. COREY, L., RUBIN, R. J., THOMPSON, T. R., NOBLE, G. R., CASSIDY, F., HATTWICK M. A., GREGG, M. B. & EDDINS, D. 1977. Influenza B-associated Reye's syndrome: incidence in Michigan and potential for prevention. *J. Infect. Dis.* **135**: 398-407.
44. LANDAY, S. E. 1977. Varicella hepatitis and Reye's syndrome: an interrelationship?. *Pediatrics.* **60**: 746-748.
45. COUCH, R. B., WEBSTER, R. G., KASEL, J. A. & CATE, T. R. 1979. Efficacy of purified influenza subunit vaccines and relation to the major antigenic determinants on the hemagglutinin molecule. *J. Infect. Dis.* **140**: 553-559.
46. BEUTNER, K. R., CHOW, T., RUBI, E., Strussenberg, J., CLEMENT, J. & OGRA, P. I. 1979. Evaluation of a neuroaminidase-specific influenza A virus vaccine in children: antibody responses and effects on two successive outbreaks of natural infection. *J. Infect. Dis.* **140**: 840-850.
47. HOKE, C. H. Jr., HOPKINS, J. A., MEIKLEJOHN, G. & MOSTOW, S. R. 1979. Comparison of several wild-type influenza viruses in the ferret tracheal organ culture system. *Rev. Infect. Dis.* **1**: 946-954.
48. FAINSTEIN V., MUSER, D. M. & CATE, T. R. 1980. Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. *J. Infect. Dis.* **141**: 172-176.
49. ROCCHI, G., CARLIZZA, L., ANDREONI, M., RAGONA, G., PIGA, C., PELOSIO, A. & VOLPI A. 1979. Protection from natural infection after live influenza virus immunization in an open population. *J. Hyg.* **82**: 231-236.
50. ROCCHI, G., RAGONA, G., PIGA, C., PELOSIO, A., VOLPI, A., VELLA, S., LEGNITI, N. & DE FELICI, A. 1979. Influenza vaccination with live-attenuated and inactivated virus vaccines during an outbreak of disease. *J. Hyg.* **83**: 383-390.
51. FRANK, A. L., TABER, L. H., GLEZEN, W. P., PAREDES, A. & COUCH, R. B. 1979. Reinfection with influenza A (H3N2) virus in young children and their families. *J. Infect. Dis.* **140**: 829-836.
52. HAYDEN, F. G., HALL, W. J. & DOUGLAS, R. G. Jr. 1980. Therapeutic effects of aerosolized amantidine in naturally acquired infection due to influenza A virus. *J. Infect. Dis.* **141**: 535-542.
53. BRYSON, Y. J., MONAHAN, C., POLLACK, M. & SHIELDS, W. D. 1980. A prospective double-blind study of side effects associated with the administration of amantidine for influenza A virus prophylaxis. *J. Infect. Dis.* **141**: 543-547.
54. HAYDEN, F. G., COTE, K. M. & DOUGLAS, R. G. Jr. 1980. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**: 865-870.
55. GLEZEN, W. P., LODA, F. A., CLYDE, W. A., SHEAFFER, C. I., CONLEY, W. G. & DENNY, F. W. 1971. Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *J. Pediatr.* **78**: 397-406.
56. GLEZEN, W. P. & DENNY, F. W. 1973. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *New Engl. J. Med.* **288**: 498-505.
57. DOWNHAM, M. A. P. S., MCQUILLIN, J. & GARDNER, P. S. 1974. Diagnosis and clinical significance of parainfluenza virus infections in children. *Arch. Dis. Child.* **49**: 8-15.
58. CHANOCK, R. M., ROIZMAN, B. & MYERS, R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* **66**: 281-290.

59. CHANOCK, R. M. & FINBERG, L. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. *Am. J. Hyg.* **66**: 291-300.
60. CHANOCK, R. M., KIM, H. W., BRANDT, C. D. & PARROTT, R. H. 1976. Respiratory syncytial virus. In: A. S. EVANS, (Ed.). *Viral Infections of Humans*. New York, John Wiley & Sons, 365-382.
61. KIM, H. W., ARROBIO, J. O., BRANDT, C. D., JEFFRIES, B. C., PYLES, G., REID, J. L., CHANOCK, R. M. & PARROTT, R. M. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D. C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am. J. Epidemiol.* **98**: 216-225.
62. PARROTT, R. H., KIM, H. W., ARROBIO, J. O., HODES, D. S., MURPHY, B. R., BRANDT, C. C., CAMARCO, E. & CHANOCK, R. M. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D. C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am. J. Epidemiol.* **98**: 289-300.
63. HALL, C. B., KOPELMAN, A. E., DOUGLAS, R. G. JR., GEIMAN, J. M. & MEAGHER, M. P. 1979. Neonatal respiratory syncytial virus infection. *New Engl. J. Med.* **300**: 393-396.
64. SIMS, D. G., DOWNHAM, M. A. P. S., MC QUILLIN, J. & GARDNER, P. S. 1976. Respiratory syncytial virus infection in North-east England. *Brit. Med. J.* **2**: 1095-1098.
65. DOWNHAM, M. A. P. S., SCOTT, R., SIMMS, D. G., WEBB, J. K. G. & GARDNER, P. S. 1976. Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. *Brit. Med. J.* **2**: 274-276.
66. TYERYAR, F. J. JR., RICHARDSON, L. S. & BELSHE, R. B. 1978. Report of a workshop on respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. *J. Infect. Dis.* **137**: 835-846.
67. HALL, C. B. 1979. Respiratory syncytial virus. In: MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. D. JR. & BENNET J. E. (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Wiley & Sons, 1186-1203.
68. HALL, C. B., DOUGLAS, R. G. JR., GEIMAN, J. M. & MESSNER, M. K. 1975. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *New Engl. J. Med.* **293**: 1343-1346.
69. HALL, C. B., DOUGLAS, R. G. JR. & GEIMAN, J. M. 1980. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **141**: 98-102.
70. HIERHOLZER, J. C. & HIRSCH, M. S. 1979. Croup and pneumonia in human infants associated with a new strain of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **140**: 826-828.
71. HRUSKA, J. F., BERNSTEIN, J. M., DOUGLAS, R. G. JR. & HALL, C. B. 1980. Effects of ribavirin on respiratory syncytial virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**: 770-775.
72. POOLE, P. M. & TOBIN, JO'H. 1973. Viral and epidemiological findings in MRC/PHLS survey of respiratory disease in hospital and general practice. *Postgrad. Med. J.* **49**: 778-787.
73. GARDNER, P. S. 1973. Respiratory syncytial virus infections. *Postgrad. Med. J.* **49**: 788-791.
74. CLARKE, S. K. R., GARDNER, P. S., POOLE, P. M., SIMPSON, H., TOBIN JO'H, 1978. Respiratory syncytial virus infection: admissions to hospital in industrial, urban and rural areas. *Brit. Med. J.* **2**: 796-798.