

## 50. UN NUOVO METODO IMMUNOBIOLOGICO PER LA IDENTIFICAZIONE DEI VIRUS AFTOSI.

I tentativi di ricerca di un metodo pratico ed esatto per l'identificazione dei vari virus aftosi, sono sorti contemporaneamente alle osservazioni e conclusioni del Vallée e Carré <sup>(1)</sup> (1921), i quali per primi, misero in evidenza la pluralità del virus aftoso.

Più tardi (1926), Waldmann e Trautwein <sup>(2)</sup>, dopo scrupolose ricerche eseguite con 30 ceppi di virus aftoso di provenienza tedesca e straniera, non solo confermarono l'esistenza dei due tipi Vallée O e A (secondo la nomenclatura tedesca denominati A e B), ma riuscirono ad identificare un terzo tipo designandolo con la lettera C (capace di sorpassare l'immunità prodotta dagli altri due virus) ed a mettere in evidenza numerose virus-varianti.

Noi non vogliamo addentrarci pel momento nell'ancora oscuro problema delle così dette « virus-varianti », che generalmente infettano gli animali immuni verso i virus A-B-C (nella recente epizoozia del 1937-1938 infettarono però solo gli animali immuni verso il virus B mentre gli altri rimasero protetti), tanto più ora che è stato accertato (Waldmann e Nagel) <sup>(1)</sup> che dette « virus-varianti » se vengono passate giornalmente nella cavia, finiscono col far prevalere un determinato virus-tipo. Questo virus-tipo, una volta reso fisso attraverso la cavia, conserva i suoi caratteri senza modificarsi anche per qualche anno e ciò è stato dimostrato in questi ultimi 15 anni, in più di 100 esami di purezza dei virus (Waldmann e Nagel) <sup>(1)</sup>. La trasformazione di un determinato virus in un altro diverso tipo nella cavia, finora non è riuscita. Solo Manninger e Laszlo <sup>(3)</sup>, affermano d'essere riusciti a trasformare in un anno, il virus B e C nel virus A attraverso la cavia. Waldmann e la sua Scuola non confermarono tali risultati per cui considerano, alla stregua delle loro ricerche, e conservano i tre virus-tipi-standard delle cavie A-B-C ed i relativi virus-tipi-standard bovini.

Sulla scorta di tali osservazioni, noi pure ci siamo attenuti alla classificazione dei tre virus aftosi A-O-C (denominazione francese) ed abbiamo iniziato la ricerca di un metodo di identificazione coi tre su citati virus, che da qualche anno vengono passati nella cavia per il controllo di Stato del siero iperimmune antiaftoso prodotto nel Regno.

#### METODI PRECEDENTI D'IDENTIFICAZIONE.

Le constatazioni di Sichert e Modrow (<sup>4</sup>), circa la possibilità di differenziare i singoli virus, mettendo in evidenza la loro differente grandezza mediante l'ultrafiltro di Bechhold ed il metodo di Ciuca (<sup>5</sup>), confermato da Helm (<sup>6</sup>), inteso a dimostrare mediante la reazione della fissazione del complemento, la diversità delle loro qualità antigeniche, riscontrata nei singoli virus, non sono stati da noi presi in considerazione per il fatto che il primo metodo non è ancora stato confermato e poi perchè entrambi non rispondenti a quel senso di praticità e precisione che deve avere detta ricerca.

Le esperienze iniziali compiute dal Wandmann e Trautwein (<sup>7</sup>) con ceppi italiani, francesi e tedeschi, onde appurare la esistenza di una pluralità di virus, ed esposte in una loro preliminare nota, furono negative ed in netto contrasto con le constatazioni e conclusioni di Vallée e Carré. Più tardi tali esperienze vennero riprese dagli autori con 30 ceppi di virus bovino e suino che vennero trasmessi alla cavia. Agli animali che superarono la malattia vennero eseguite reinfezioni da 20 a 30 giorni dopo la prima infezione sia col ceppo omologo che con quello eterologo sì da poter giungere alla determinazione di tre tipi diversi di virus: A-B-C. La infezione con un tipo di virus non conferì all'animale alcuna immunità contro gli altri due tipi, sì che fu possibile infettare a breve distanza di tempo tre volte lo stesso animale. Identici risultati furono ottenuti dagli AA. mediante tentativi di protezione passiva con siero antiaftoso. Con tali metodi essi riuscirono così ad identificare 76 ceppi nei virus-tipi A-B-C ed un discreto numero di virus-varianti. Tali ricerche di identificazione furono pure condotte, sempre dai su citati ricercatori, sui bovini e di essi solo una *certa percentuale* fu suscettibile alla reinfezione con gli

altri due ceppi, cosa che gli AA. riferiscono ad un residuo di immunità acquisita nel corso di una precedente, probabile, ma non nota infezione aftosa.

### PARTE SPERIMENTALE.

Sulla scorta di tali cognizioni, noi pure abbiamo iniziato tentativi di identificazione di un ceppo isolato nella recente infezione aftosa della Sardegna, mediante prove di immunità crociata. In un primo tempo cerammo di provocare tale immunità mediante trasmissione sperimentale della malattia nella cavia. Con tale metodo le nostre ricerche fallirono completamente per il fatto che mai si riuscì a reinfettare gli animali dopo 25-30 giorni poichè la maggior parte di essi vennero a morte prima di tale periodo di tempo, e quei pochi che sopravvissero non si poterono reinfettare a motivo di tutti gli inconvenienti provocati dalla generalizzazione del virus (comparsa delle così dette afte secondarie, rottura delle stesse con successiva formazione in tale punto di un escara). La causa di tutto ciò? Forse in relazione al fatto che i nostri ceppi frequentemente passati da diverso tempo attraverso la cavia, e capaci di produrre al momento delle esperienze un'afte primaria in 18-24 ore e di generalizzare entro 48 ore, invece di provocare un'immunità artificiale si fossero ancor più virulentati?

Iniziammo allora nuovi tentativi di immunità crociata cercando di provocare nelle cavie un'immunità passiva inoculando loro siero-antiaftoso iperimmune preparato da diversi Istituti, fino alla dose di 0,6 cc. per animale. Tutti i gruppi animali così immunizzati e trattati coi diversi tipi di virus contrassero la così detta afte primaria per generalizzare in seconda o terza giornata.

Dopo questi risultati negativi ci siamo allora orientati alla ricerca di un metodo biologico mediante prove di immunità crociata su cavie inoculate con il vaccino Waldmann-Köbe. Il ceppo da identificare, isolato come già dissi durante la recente infezione aftosa in Sardegna, che per brevità abbiamo designato con la lettera S, e gli altri tre virus, furono passati attraverso alla cavia fino a produrre l'afte primaria in 18-24 h. e la generalizzazione in 48 h. Tutte le trasmissioni alle cavie furono fatte

mediante un'unica iniezione intradermica, giusto il metodo recentemente descritto dal Mazzaracchio (<sup>8</sup>), metodo che ancora una volta, per la sua esattezza e maggior sensibilità è da preferirsi a tutti gli altri.

#### PREPARAZIONE DEL VACCINO.

La preparazione del vaccino è stata fatta nel modo seguente:

Le cavie, del peso non inferiore ai 400 gr., destinate a fornire il virus furono divise in 4 gruppi di 10 animali ciascuno ed inoculate con una sola iniezione intradermica nel cuscinetto plantare, con i tre virus A-O-C ed il virus S da identificare.

Nelle cavie con la così detta « afta primaria » ben sviluppata di 18-24 ore venne eseguito il lavaggio dello zampino con soluzione fisiologica sterile; gli animali vennero poscia sacrificati e lo zampino asportato. Il contenuto delle vescicole primarie ed i lembi aftosi furono prelevati e finemente triturati con polvere di vetro a grana grossa. In media, ogni cavia ci ha fornito da 7 a 10 ctg. di materiale-virus. Al materiale così finemente sminuzzato vi si aggiunge tanta acqua distillata da ridurlo al 7%; la soluzione venne chiarificata mediante centrifugazione e filtrazione dapprima su carta e poscia attraverso candela Chamberland L<sub>3</sub> capace di trattenere i germi. Successivamente abbiamo preparato una miscela che in 100 cc. conteneva: 50 cc. di idrossido di alluminio Willstaetter, preparato secondo il metodo Schmidt; 10 cc. del virus filtrato, 40 cc. di acqua distillata sterile e 0,05 cc. di formalina Scherhing. Come si nota, abbiamo sostituito la soluzione di glicocollo-tampone con acqua distillata sterile per il fatto che il nostro vaccino veniva immediatamente usato appena preparato, per cui il suo  $\text{ph}=9$  non poteva subire mutazione di sorta, e perciò l'aggiunta della su citata soluzione tampone diveniva cosa superflua. La miscela di colore lattescente venne in seguito messa in un agitatore per un'ora, versata in recipienti e messa in termostato a 25° per 48 h. e poscia per qualche ora in frigorifero a 5°.

#### PROVE DI IMMUNITÀ CROCIATA.

Coi quattro vaccini, preparati coi noti virus A-O-C e con quello S da identificare, abbiamo inoculato per via sottocutanea 4 lotti distinti di

10 cavie ciascuno colla quantità e modalità che in seguito vengono riportate. Dopo qualche giorno, si poteva già notare al punto di inoculazione una piccola reazione locale, dura, della grandezza di una nocciola, che dopo qualche giorno scomparve gradatamente.

Le cavie così trattate coi rispettivi vaccini-virus e tenute in quattro ampie gabbie, vennero successivamente infettate dopo 15-20 giorni coi vari virus compreso quello da identificare. Cinque cavie del primo lotto vennero inoculate con 2 cc. di vaccino virus S e 5 con 3 cc.; dopo circa 20 giorni, due di queste furono infettate col virus A, tre con il virus O, due col C e tre con il virus S. Le cavie infettate col virus O e S non contrassero l'afta, mentre nelle altre, infettate col virus A e C comparve un'afta primaria dopo 48 h. per generalizzare in terza giornata (V. tabella I).

TABELLA I.

CAVIE INOCULATE CON VACCINO-VIRUS S IL 26-6-1939-XVII.

Numero d'ordine delle cavie	Data	Dose del vaccino	Infettate con virus:							
			A		O		C		S	
			Risultati		Risultati		Risultati		Risultati	
			Afta prim.	Generalizzaz.	Afta prim.	Generalizzaz.	Afta prim.	Generalizzaz.	Afta prim.	Generalizzaz.
1	17-7	3 cc.	19-7	20-7						
2	17-7	2 cc.	19-7	20-7						
3	17-7	3 cc.			—	—				
4	17-7	2 cc.			—	—				
5	17-7	3 cc.			—	—				
6	17-7	2 cc.					19-7	20-7		
7	17-7	3 cc.					19-7	20-7		
8	17-7	2 cc.							—	—
9	17-7	3 cc.							—	—
10	17-7	2 cc.							—	—

Già da questi primi risultati si potè supporre che il virus S in esame e il virus O fossero identici.

Del secondo lotto di cavie vaccinate il 1-7-1939, 5 vennero immunizzate con 2 cc. di vaccino-virus A e le altre 5 con 3 cc.; diciassette



Del terzo lotto di cavie immunizzate metà con 2 cc. e metà con 3 cc. di vaccino-virus O il 1-7-1939, furono infettate il 19 dello stesso mese, 2 col virus A, 2 con l'O, 2 col C e 4 col virus S. Contrassero un' afta primaria di 48 h. e generalizzarono il giorno seguente le cavie infettate col virus A e C, mentre quelle infettate col virus O, solo in una comparve una piccola afta primaria di 48 h. senza peraltro generalizzare.

Le cavie infettate col virus S non contrassero l' afta (V. tabella III).

Infine, l'ultimo lotto di cavie venne immunizzato con la medesima tecnica e dose col vaccino-virus C e gli animali infettati coi soliti virus in questione. Le cavie infettate coi virus A-O-S contrassero tutte un' afta primaria chi di 48 h., chi di 60 h. per generalizzare la maggior parte il giorno successivo. Di quelle infettate col virus C, solo una contrasse un' afta primaria senza peraltro generalizzare (V. tabella IV).

TABELLA IV.

CAVIE INOCULATE CON VACCINO-VIRUS C IL 6-7-1939-XVII.

Numero d'ordine delle cavie	Data	Dose del vaccino	Infettate con virus:							
			A		O		C		S	
			Risultati		Risultati		Risultati		Risultati	
			Afta prim.	Gene-ralizzaz.	Afta prim.	Gene-ralizzaz.	Afta prim.	Gene-ralizzaz.	Afta prim.	Gene-ralizzaz.
31	19-7	3 cc.	21-7	22-7						
32	19-7	2 cc.	21-7	22-7						
33	19-7	3 cc.			21-7	22-7				
34	19-7	2 cc.			21-7	22-7				
35	19-7	3 cc.								
36	19-7	2 cc.					—	—		
37	19-7	3 cc.					21-7	—		
38	19-7	2 cc.							22-7	23-7
39	19-7	3 cc.							21-7	23-7
40	19-7	2 cc.							22-7	23-7

CONCLUSIONI.

In seguito ai risultati negativi ottenuti su cavie infettate artificialmente e su cavie immunizzate passivamente, ed in considerazione del-

l'esito delle prove di immunità crociata su cavie immunizzate col vaccino Waldmann e Köbe abbiamo sufficiente motivo per concludere che:

1) Mediante prove di immunità crociata eseguite su cavie immunizzate col vaccino Waldmann-Köbe da noi preparato, siamo riusciti ad identificare nel virus O Vallée, il virus isolato nella recente infezione aftosa della Sardegna.

2) Le proprietà immunizzanti dei nostri vaccini monovalenti si sono mostrate notevoli e strettamente specifiche nei confronti del virus col quale venivano preparati.

3) Il nuovo metodo immunobiologico si è dimostrato di una particolare praticità, esattezza ed ha mostrato la possibilità di poter identificare numerosi virus aftosi anche per la durata di qualche mese (esperienze nostre in corso sono appunto intese a dimostrare la durata di tale immunità attiva nella cavia).

4) Tale metodo immunobiologico potrebbe nello stesso tempo, venire usato per controllare l'attività dei vaccini antiaftosi, qualora detto controllo di Stato fosse reso obbligatorio, e per mettere in luce la valenza dei vaccini da esaminare.

Abbiamo infine motivo di ritenere che tale metodo d'identificazione potrà dare un non indifferente contributo allo studio del problema della pluralità del virus ed a quello ancora più oscuro sulla possibilità delle trasformazioni di detti virus e sull'esistenza delle così dette « virus-varianti ».

#### RIASSUNTO

L'A., dopo avere accennato ai risultati negativi ottenuti mediante tentativi di immunità crociata su cavie immunizzate sia artificialmente che passivamente, espone un nuovo metodo biologico per l'identificazione dei virus aftosi.

Tale metodo eseguito dall'A. su cavie immunizzate col vaccino Waldmann-Köbe, ha dato ottimi risultati e la possibilità di identificare nel virus O Vallée il ceppo isolato nella recente infezione aftosa della Sardegna.

### SUMMARIUM

Principio Auctor breviter significat, experimenta cruciatae, quam dicimus, inmunitatis ab ipso in caviis temptata, quae artificiose vel passive inmunes factae essent, exitus habuisse negativos; deinde novam quandam exponit methodum biologicam, qua virus apthosum quonam genere sit plane possit agnosci. Hac methodo Auctor usus est in caviis, quas pure vaccino Waldmann-Koebe inmunes fecerat, optimos adeptus exitus.

Illud insuper factum est, ut cippus in sardiniensi apthosa pestilentia nuper segregatus idem esse ac virus O'Valles plane ac prorsus appareret.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.

### BIBLIOGRAFIA

(<sup>1</sup>) VALLÉE e CARRÉ citato nel: Handbuch der Viruskrankheiten I B, p. 410, 1939, V.V.G. Fischer in Jena; WALDMANN e NAGEL citato nel: Handbuch der Viruskrankheiten I B, p. 411, 1939, V.V.G. Fischer in Jena.

(<sup>2</sup>) WALDMANN O. u. TRAUTWEIN K., « Experimentelle Untersuchungen über die Pluralität des M. K. S.-virus », B. tierärztl. W., 569 (1926).

(<sup>3</sup>) MANNINGER e LASZLO S. v., « Expériences sur la pluralité du virus aphteux », Bull. mens. Off. internat. Epizoot., 3, 402 (1936).

(<sup>4</sup>) SICHERT-MODROW, « Filtration und Ultrafiltration des M. K. S.-virus », Z. Mgg., 110, 618 (1929).

(<sup>5</sup>) CIUCA A., « The Reaction of Complement Fixation in Foot-and-Mouth Disease as a Mean of Identifying the Different Types of Virus », J. of. Mgg. 28, 325 (1939).

(<sup>6</sup>) HELM R., « Die Differenzierung der Virustypen der M. K. S. durch die Komplementbindung », Zbl. Bakt. I. Orig., 130, 305 (1933).

(<sup>7</sup>) WALDMANN O. u. MAYR K., « Experimentelle Untersuchungen über die Richtigkeit der französischen Auffassung von der Pluralität des M.K.S. virus », B. tierärztl. W., 37 (1924).

(<sup>8</sup>) MAZZARACCHIO V., « La trasmissione sperimentale dell'Afta Epiz. alla cavia », questi Rendiconti, 1, I, 303-311 (1938).