

16. L. ADDAMIANO, B. BABUDIERI, C. MOSCOVICI. — **Ricerche sugli aspetti morfologici del virus influenzale.**

Riassunto. — Mentre il virus influenzale del tipo « B » si presenta in forma di granuli, in quello del tipo « A » sono presenti anche forme a bastoncino. Queste ultime e quelle filamentose costituiscono in genere la maggioranza del virus appartenente al tipo « A₁ ».

Gli AA. hanno voluto controllare se in particolari condizioni sperimentali sia possibile alterare le proporzioni reciproche dei due tipi morfologici del virus, e a questo scopo hanno incubato le uova embrionate inoculate con il virus, a temperature diverse; hanno inoculato embrioni a diversi stadi di sviluppo; hanno infettato uova con dosi progressive di virus; hanno esaminato il liquido allantoideo infetto tenuto per periodi diversi di tempo in ghiacciaia; hanno controllato il virus nel liquido allantoideo da poche ore dopo la inoculazione fino a 6 giorni dopo questa; hanno studiato la possibile azione di antibiotici inoculati nell'embrione contemporaneamente al virus.

Queste ricerche hanno dimostrato che nei ceppi in cui le due forme di virus coesistono, granuli e filamenti compaiono pressochè contemporaneamente, e che nelle diverse condizioni sperimentate i rapporti quantitativi reciproci delle due forme non mutano.

Résumé. — Tandis que le virus de l'influenza du type «B» se présente en forme de granulations, des formes à bâtonnet se trouvent en plus dans le type «A». Ces dernières formes ainsi que les formes filamenteuses constituent en général la plus grande partie du virus appartenant au type «A₁».

Les auteurs ont voulu chercher si, dans des conditions particulières d'expérience, il était possible de faire subir des altérations aux proportions réciproques des deux types morphologiques du virus, et dans ce but ils ont soumis à l'incubation des oeufs embryonnés injectés avec le virus, à différentes températures; ils ont pratiqué des injections à des embryons à différents stades de développement; ils ont infecté des oeufs avec des doses progressivement plus fortes de virus; ils ont examiné le liquide allantoïque infecté maintenu pendant des périodes de temps différentes dans la glacière; ils ont contrôlé le virus dans le liquide allantoïque après quelques heures seulement de l'injection, jusqu'à 6 jours après celle-ci; ils ont étudié l'action possible des antibiotiques injectés à l'embryon infecté avec le virus.

Ces recherches ont démontré que dans les souches où les deux formes de virus coexistent, les granulations et les filaments paraissent en même

temps, et que dans les différentes conditions expérimentales, les rapports quantitatifs réciproques des deux formes ne subissent pas de changement.

Summary. — Type « B » influenza virus appears in granular form, while in type « A » rod-shaped forms are also present. Together with filamentous forms, the latter generally predominate in virus belonging to type « A₁ ».

In an attempt to ascertain the possibility of producing variations in the relative proportions of the two morphological types of virus in particular experimental conditions, the authors incubated embryonated eggs inoculated with the virus at different temperatures, inoculated embryos at various stages of development, infected eggs with progressive doses of the virus, examined infected allantoic fluid kept on ice-box for various periods of time, tested the infected allantoic fluid from a few hours to six days after inoculation, and studied the effect of antibiotics inoculated into the embryo simultaneously with the virus.

It has been shown by these experiments that with strains in which the two forms of the virus, granular and filamentous, coexist, they appear practically simultaneously in the infected eggs, and that the quantitative relation between the two forms does not change in different experimental conditions.

Zusammenfassung. — Während der B-Typ des Influenzavirus sich in Form von Körnchen darstellt, gibt es bei dem Typ A auch Stäbchenformen. Diese wie auch die Fadenformen bilden im allgemeinen die Mehrheit des Types A₁.

Die Verfasser wollten feststellen, ob es unter besonderen Versuchsbedingungen möglich sei, das gegenseitige Verhältnis der beiden morphologischen Typen des Virus zu ändern. Zu diesem Zweck wurden embryonierte Eier nach Einimpfung des Virus bei verschiedenen Temperaturen bebrütet. Ferner wurden Eier mit verschiedenen Dosen des Virus infiziert. Ausserdem haben die Verfasser infizierte Allantoisflüssigkeit untersucht, die während verschieden langer Zeitperioden im Eisschrank gehalten worden war. Weiterhin wurde der Virus in der Allantoisflüssigkeit zu verschiedenen Zeiten von wenigen Stunden bis zu 6 Tagen nach der Einimpfung kontrolliert. Schliesslich wurde die mögliche Wirkung von Antibiotika, die gleichzeitig mit dem Virus dem Embryo eingeimpft worden waren, einer genauen Prüfung unterzogen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass bei den Stämmen, bei denen die beiden Formen des Virus nebeneinander vorhanden sind, Körnchen

und Fäden fast gleichzeitig auftreten. Ausserdem wurde erwiesen, dass unter den verschiedenen Versuchsbedingungen das quantitative Verhältnis der beiden Formen zueinander keiner Veränderung unterliegt.

Come è noto, la forma tipica del virus influenzale è quella di piccole sfere di circa 100 m μ di diametro. Accanto a queste formazioni sono però presenti anche altri elementi in forma di bastoncini o di filamenti più o meno lunghi. In alcuni ceppi anzi tali elementi prendono addirittura il sopravvento su quelli sferici.

Queste forme filamentose furono descritte per la prima volta nel 1946 da MOSLEY e da WYCKOFF ⁽¹⁾ e ritrovate poco dopo (1949) da CHU e coll. ⁽²⁾ e da BABUDIERI e ARCHETTI ⁽³⁾. Sulla loro interpretazione si è molto discusso e non è mancato chi ha voluto affermare che esse non hanno alcun rapporto con il virus influenzale, ma che provengono invece, in maniera del tutto aspecifica, dalle cellule della membrana chorion-allantoidea ⁽⁴⁾.

Per quanto non si possa negare che, particolarmente in determinate condizioni, filamenti di tale origine possano trovarsi nel liquido allantoideo, tuttavia è del pari indubbio che il virus influenzale possa assumere la forma di bastoncini o di filamenti. Al microscopio elettronico essi possono venir agevolmente distinti dai filamenti banali di origine cellulare.

Tre ipotesi possono essere fatte per spiegare i rapporti intercorrenti fra la forma sferica e quella filamentosa del virus influenzale, e più precisamente: 1) le due forme sono tra loro del tutto indipendenti e ciascuna di esse si sviluppa per conto suo, senza che sia possibile una trasformazione dall'una all'altra; 2) il virus influenzale si origina nell'interno delle cellule in forma granulare; i singoli granuli possono successivamente fondersi tra di loro così da costituire bastoncini o filamenti; 3) il virus influenzale fuoriesce dalla cellula in forma di filamenti. Questi successivamente si segmentano e si frammentano, trasformandosi nella forma granulare.

Il fatto che tra i filamenti aventi aspetto omogeneo si trovano altri con accenni di segmentazione o con aspetto a corona di rosario fa ritenere possibile il passaggio dall'una all'altra delle due forme sotto cui il virus influenzale si può presentare.

Ricordiamo inoltre che in alcuni casi e più spesso nel ceppo « PR8 », è possibile osservare, accanto alla forma granulare, altre forme a disco, piuttosto appiattito, talvolta ombellicato, meno rilevate delle forme gra-

nulari, se osservate al microscopio elettronico previa ombratura. Le dimensioni di questi dischi sono abbastanza variabili e vanno da un diametro presso a poco corrispondente a quello delle forme granulari, fino a diametri 6-7 volte maggiori. In qualche caso il disco è provvisto di una breve appendice a bastoncino che lo fa rassomigliare a una padella. Queste forme, già viste nel 1949 da uno di noi, sono state segnalate di recente anche da ARCHETTI (5). E' dubbio che queste forme siano da riferirsi al virus influenzale. E' più probabile che esse provengano dalle cellule della membrana chorion-allantoidea e che abbiano un significato degenerativo. Ad ogni modo non è nostra intenzione discutere in questa prima nota il significato ed i possibili rapporti reciproci di questi vari aspetti morfologici. Il nostro proposito è stato soltanto quello di controllare se variazioni di condizioni sperimentali possano influire sulla loro maggiore o minore frequenza relativa.

Metodo: I ceppi influenzali prevalentemente usati nelle nostre esperienze sono stati: quello « Roma 2 » e quello « PR8 ». Il primo ceppo appartiene al tipo A₁ ed è stato isolato nel 1949 da BABUDIERI ed ARCHETTI, il secondo ceppo è il classico e ben noto rappresentante del tipo A. Il ceppo « Roma 2 » dà nel liquido allantoideo una ricchissima produzione di filamenti; quello PR8 invece assume quasi esclusivamente l'aspetto granulare e, solo di rado, si presenta in forma di brevi bastoncini.

Le modalità con le quali questi ceppi sono stati inoculati nell'embrione di pollo, verranno esposte in seguito, quando diremo delle singole esperienze.

Lo studio degli aspetti morfologici del virus è stato eseguito in due modi: 1) esaminando direttamente in campo oscuro una piccola quantità di liquido allantoideo infettato; 2) studiando il virus influenzale al microscopio elettronico. A questo scopo abbiamo ritenuto opportuno rinunciare al semplice metodo da molti praticato di adsorbire il virus alle emazie che, lavate, vengono successivamente deposte sul film di collodio. Poichè non sappiamo se l'adsorbimento alla superficie delle emazie avvenga in egual misura e con eguali modalità sia per le forme granulari, sia per quelle filamentose, adottando tale metodo si sarebbe potuto incorrere in errori di valutazione. Abbiamo perciò preferito ricorrere al più sicuro, se anche più indaginoso, metodo di concentrare il virus influenzale mediante ultracentrifugazione (ultracentrifuga Huguenard, 120.000 g per 15 minuti). Il sedimento veniva quindi fissato con acido osmico al 2% e successivamente lavato per due volte con acqua distillata mediante ultracentrifugazione. Il materiale così raccolto veniva quindi osservato o direttamente o previa metallizzazione.

E' da notarsi che in campo oscuro, qualora si disponga di una intensa sorgente luminosa, è possibile osservare bene sia i granuli che i filamenti, ma che non è possibile distinguerli da altri granuli o filamenti di origine banale. L'osservazione in campo oscuro può dare una rapida e, alle volte, preziosa indicazione; sono però sempre necessari un controllo ed una conferma che possono essere dati soltanto dall'osservazione al microscopio elettronico.

Ricordiamo che su ogni campione di liquido allantoideo raccolto veniva previamente eseguita la prova di HIRST, per avere un controllo del suo contenuto in virus.

Una prima esperienza è stata fatta coltivando i due ceppi influenzali a temperature diverse, e più precisamente a 35°, 38° e 40°. Il virus è stato inoculato nel liquido allantoideo di uova in 10^a giornata di sviluppo. Per ciascun ceppo e per ciascuna temperatura sono state impiegate due uova. Queste sono rimaste in termostato 48 ore, quindi sono state poste per 24 ore in ghiacciaia e successivamente aperte.

I titoli della reazione di Hirst sono stati rispettivamente di 1:512, 1:1024, e 1:512 per il ceppo « Roma 2 »; di 1:2048, 1:1024 e 1:2048 per quella « PR8 ». Non si è notata alcuna apprezzabile differenza della percentuale delle forme granulari rispetto a quelle filamentose, in rapporto alla differenza della temperatura di incubazione. Le prime sono state al solito prevalenti nel ceppo « PR8 », le seconde in quello « Roma 2 » ed il risultato non è cambiato quando la prova è stata nuovamente ripetuta per quanto riguarda le due temperature estreme: quella di 35° e quella di 40°.

Un secondo esperimento è stato compiuto per controllare l'eventuale influenza dell'età dell'embrione sulla produzione dei granuli e dei filamenti. A questo scopo sono stati inoculati con la solita tecnica e con i soliti ceppi, embrioni di pollo in 7°, 10°, 13° giorno di sviluppo. L'incubazione è stata prolungata per 48 ore a 38°, e le uova sono state aperte dopo le solite 24 ore di permanenza in ghiacciaia. Il titolo della reazione di Hirst è stato rispettivamente di 1:512, 1:1024 e 1:1024 per il ceppo « Roma 2 », e di 1:1024, 1:1024 e 1:2048 per quello « PR8 ». Anche in questo gruppo di prove non ci è stato possibile mettere in evidenza una qualche differenza imputabile alla diversa età di sviluppo degli embrioni inoculati.

In una terza prova abbiamo ricercato la eventuale influenza di differenti dosi di virus. A questo scopo in una serie di uova embrionate in 10° giorno di sviluppo è stato inoculato 0,1 cm³ di liquido allantoideo contenente il virus (titolo della Hirst: per il ceppo « Roma 2 » 1:1025, per quello « PR8 » 1:2048), sia non diluito, sia diluito 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000. Le uova sono state tenute al solito 48 ore in termostato e

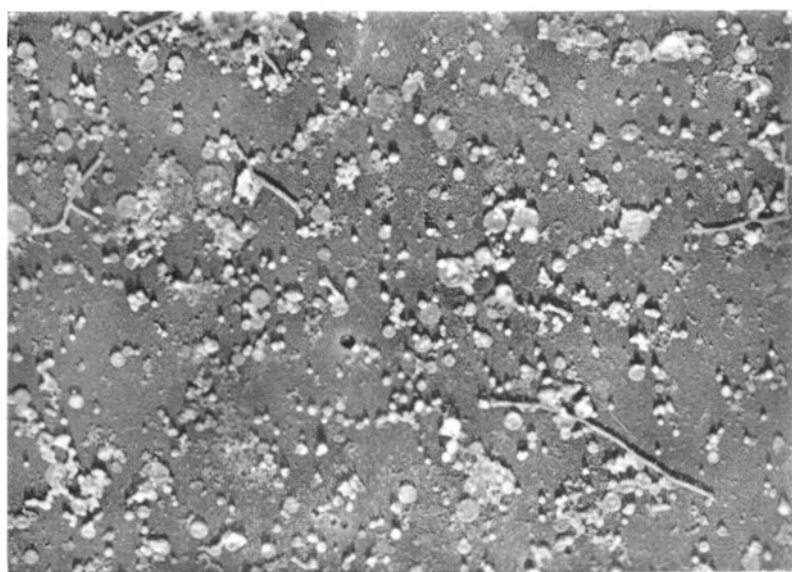


Fig. 1. - Ceppo PR8 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 38° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 48 h. Forme granulari del virus, forme a disco e qualche raro filamento e bastoncino ($\times 6.000$).

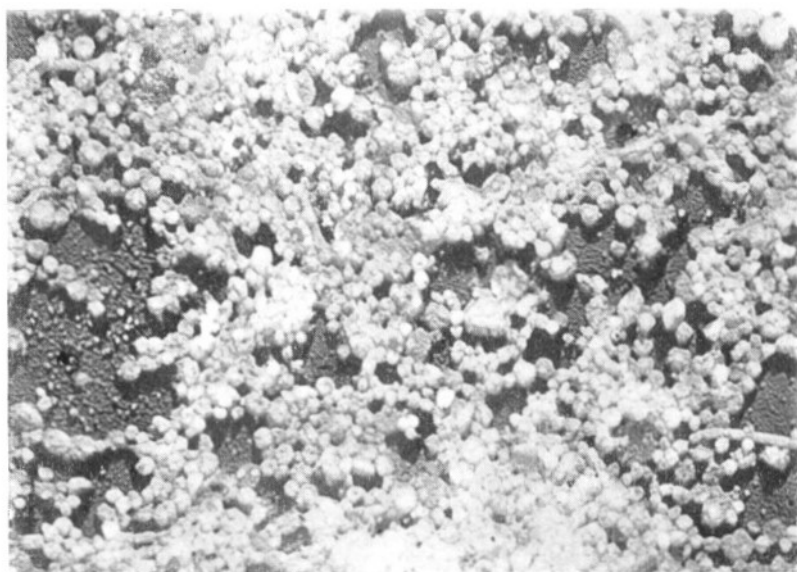


Fig. 2. - Ceppo PR8 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 38° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 24 h. Forme granulari del virus, qualche raro bastoncino ($\times 15.000$).

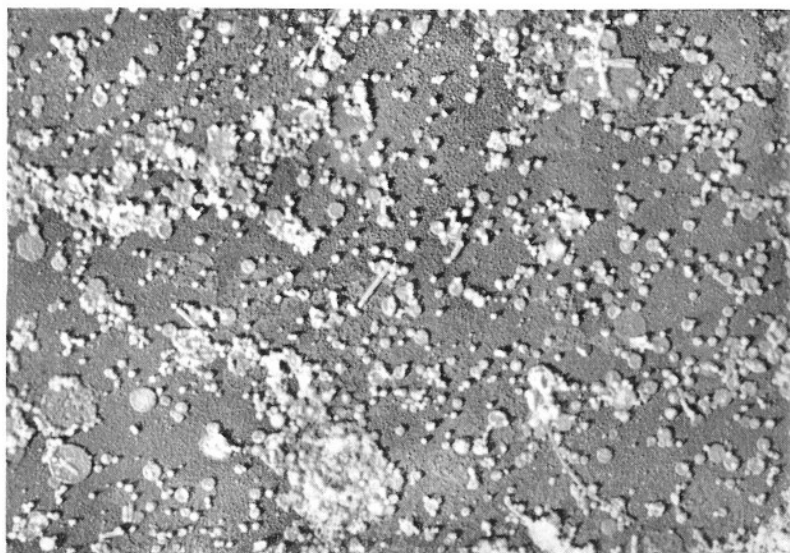


Fig. 3. - Ceppo PR8 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 35° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 24 h. Forme granulari del virus, qualche raro bastoncino, numerosi dischi piatti di grandi dimensioni ($\times 6.000$).

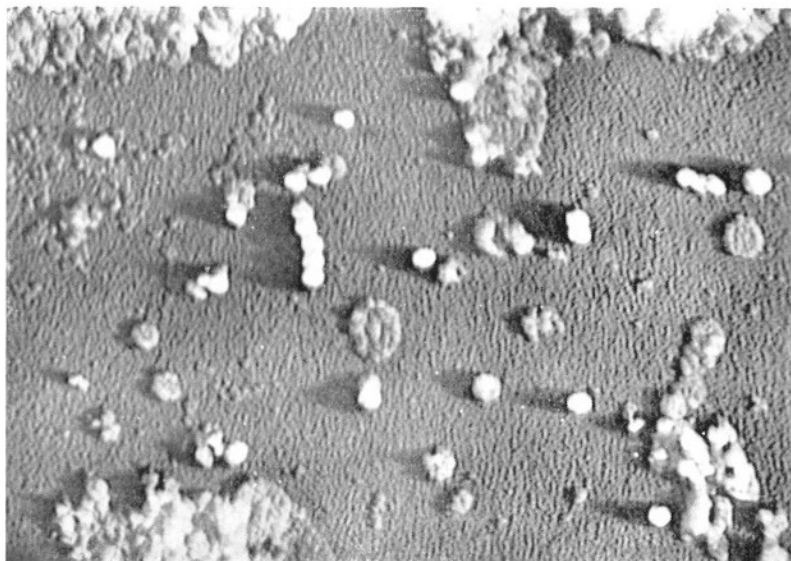


Fig. 4. - Ceppo AD1 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 38° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 24 h. Forme granulari del virus, un filamento a grani di rosario ($\times 20.000$).

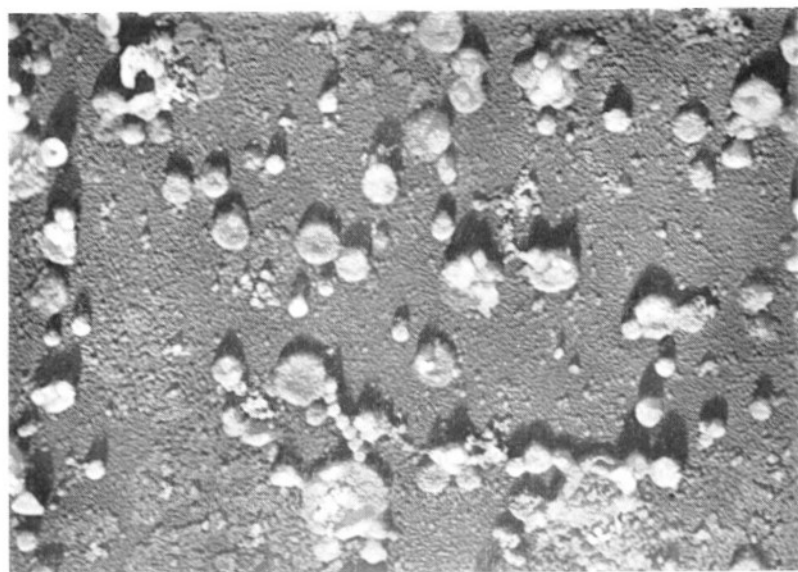


Fig. 5. - Ceppo PR8 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 38° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 48 h. Forme granulari del virus, molte forme a disco, un filamento a grani di rosario ($\times 20.000$).

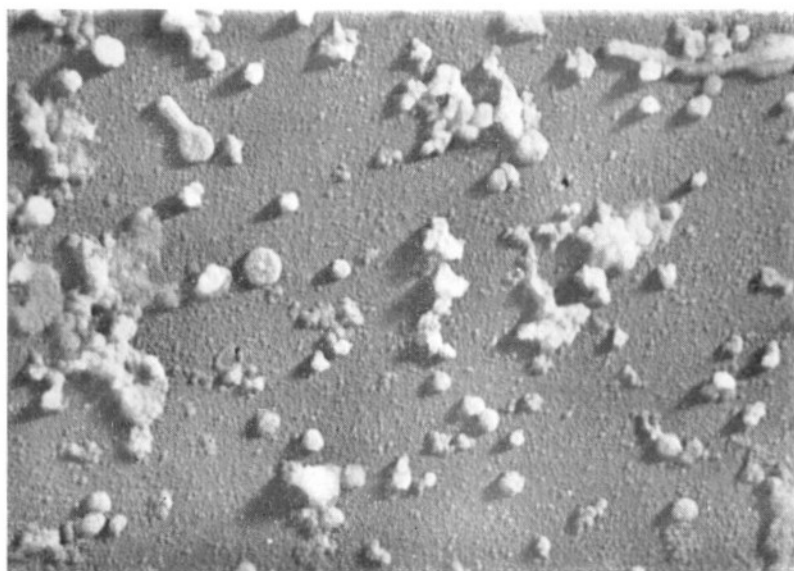


Fig. 6. - Ceppo PR8 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 38° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 24 h. Forme granulari del virus, forme a disco ed a padella ($\times 20.000$).

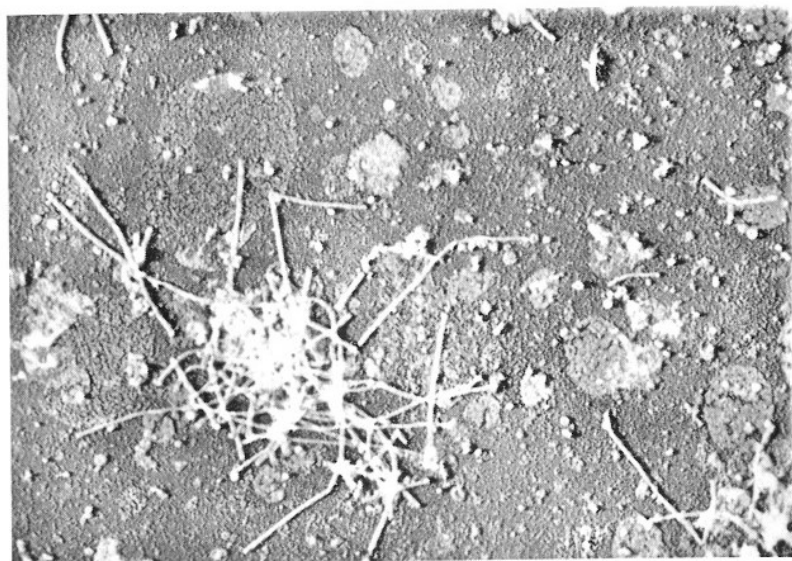


Fig. 7. - Ceppo R2 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 38° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 24 h. Numerosi filamenti, alcuni angolati ($\times 6.000$).

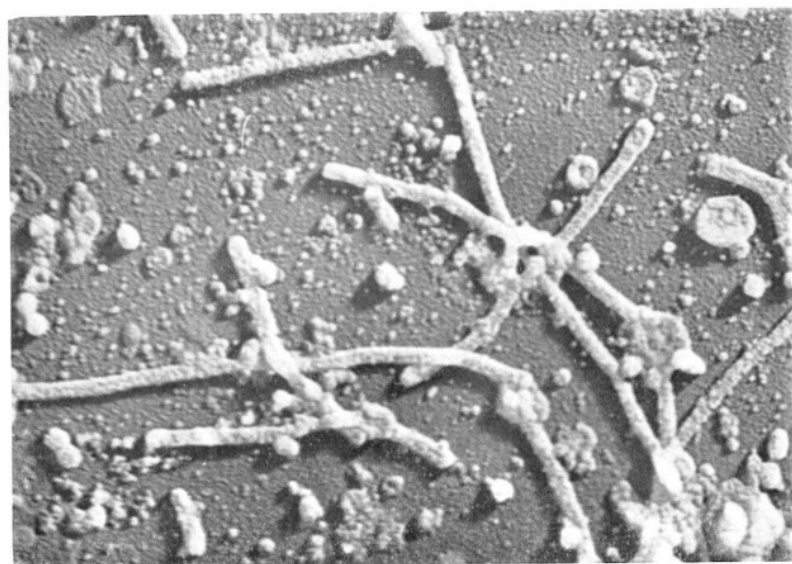


Fig. 8. - Ceppo R2 coltivato in liquido allantoideo per 48 h a 35° e lasciato a temperatura di ghiacciaia per 24 h. Produzione piuttosto notevole di filamenti, qualche forma a disco ($\times 20.000$).

24 ore in ghiacciaia. I titoli ottenuti sono stati di 1:32, 1:64, 1:512, 1:1024, 1:1024 per il ceppo « Roma 2 » e 1:1024, 1:1024, 1:1024, 1:2048 e 1:2048 per quello « PR8 ». Come si vede l'eccessiva quantità di virus inoculato sembra aver agito dannosamente sullo sviluppo del ceppo « Roma 2 », mentre non ha sensibilmente frenato lo sviluppo di quello « PR8 ».

Al microscopio elettronico e in campo oscuro non abbiamo notato alcuna particolare differenza nella serie di uova inoculate con il ceppo « PR8 »; invece nelle uova infettate con il « Roma 2 » le due prime della serie contenevano una quantità di granuli proporzionalmente maggiore che quelle successive, e parecchi dei filamenti avevano un aspetto granuloso o mostravano accenni di probabile segmentazione.

In una quarta prova abbiamo voluto esaminare se il virus contenuto nel liquido allantoideo, conservato in ghiacciaia a $+4^{\circ}$, potesse modificare la sua morfologia. Il virus è stato perciò esaminato sia subito dopo il prelievo, sia dopo 24, 48 ore, 4 ed 8 giorni. Anche qui non si è notata alcuna evidente modificazione delle proporzioni reciproche fra granuli e filamenti. Soltanto nell'ultimo prelievo eseguito del ceppo « PR8 » ci è parso di notare un certo aumento delle forme filamentose, non significativo però.

In una quinta esperienza abbiamo inoculato un lotto di uova in 10^a giornata di sviluppo, con i soliti due ceppi, ed abbiamo in seguito aperto le uova ad intervalli scalari. Le prime uova sono state aperte 6 ore dopo l'inoculazione, quando la reazione di Hirst era ancora negativa. Nel liquido allantoideo abbiamo trovato soltanto qualche rarissimo granulo che non riteniamo di poter attribuire con assoluta certezza al virus influenzale.

Le uova successive furono aperte in 12^a ora di incubazione, quando la reazione di HIRST dava il titolo di 1:8 con il ceppo « Roma 2 », e di 1:128 con il ceppo « PR8 ». Il virus del ceppo « Roma 2 » ci è apparso sotto forma di rari granuli tipici, accompagnati da qualche filamento, che però appariva un pò più sottile del solito. Il ceppo « PR8 » aveva un aspetto simile, con maggiore abbondanza dei granuli però. Anche qui i rari filamenti apparivano più sottili del solito.

Dopo 24 ore di incubazione la reazione di HIRST aveva raggiunto per i due ceppi rispettivamente i valori di 1:1024 e di 1:2048 ed il quadro morfologico dei due ceppi era quello loro tipico.

Dopo 3 giorni il quadro era pressochè immutato; dopo 6 giorni di incubazione si notava un certo aumento relativo dei granuli rispetto ai filamenti, a carico del ceppo « Roma 2 ». Nulla era mutato invece riguardo al ceppo « PR8 ».

Abbiamo ripetuto questa prova con modalità però diverse, nel senso che abbiamo prelevato dal medesimo uovo inoculato, a distanze scalari di tempo, campioni di liquido allantoideo. Il primo prelievo è stato eseguito tre ore e mezza dall'inoculazione, quando la HIRST era ancora negativa. Nel liquido abbiamo osservato qualche raro granulo, e, per il ceppo « Roma 2 », anche alcuni corti bastoncini. Dopo 5 ore la reazione di HIRST era divenuta positiva (1:16 per il « Roma 2 »; 1:32 per il « PR8 »). Nel liquido contenente il ceppo « PR8 » era visibile una certa quantità di forme granulari; in quello del ceppo « Roma 2 » i bastoncini erano aumentati e si erano allungati a formare filamenti. Nei prelievi eseguiti dopo 22 e 48 ore si era ormai stabilito il quadro morfologico tipico dei due ceppi.

Da queste ricerche non risulta che i primi elementi virali che compaiono nel liquido allantoideo appartengano ad uno solo dei due tipi morfologici: nei ceppi in cui i due tipi sono presenti, essi compaiono praticamente contemporaneamente.

Altre prove sono state eseguite, con esito negativo, per controllare se l'aggiunta di penicillina e di streptomina, che abitualmente si fa alla sospensione di virus che viene inoculato, possa favorire la comparsa dei bastoncini o dei filamenti.

Infine abbiamo esaminato qualche altro ceppo di virus influenzale, e più precisamente il ceppo LEE, di vecchio isolamento, e quello « Firenze 4 », di isolamento recente, ambedue appartenenti al tipo B, quello « FM₁ » e quello « Roma 4 » (tipo A₁) isolati nel 1949 e quelli « AD1 » e « DT », appartenenti ai tipo A₁ e da noi isolati di recente (1953). Mentre il virus dei due primi ceppi si presentava soltanto in forma granulare, quello degli altri quattro mostrava, accanto ai granuli, la presenza di numerosi bastoncini e di filamenti.

Abbiamo infine voluto controllare se un ceppo di recente isolamento, quale quello « AD1 », capace ancora di svilupparsi nel liquido amniotico, mostrasse in questo lo stesso aspetto morfologico che mostrava nel liquido allantoideo. Non abbiamo rilevato differenze apprezzabili fra i due campioni di virus sviluppatasi nei due differenti ambienti.

In conclusione dalle prove da noi eseguite risulta che, mentre la forma granulare del virus influenzale è quella tipica per il tipo B e si ritrova anche nei ceppi di recente isolamento, la forma bacillare e la filamentosa è la forma più frequente nei ceppi appartenenti al tipo A₁.

Nel ceppo « PR8 », appartenente ai tipo A, il virus assume in massima parte l'aspetto granulare e soltanto pochi elementi hanno la forma di bastoncini o di filamenti.

I due differenti aspetti morfologici che il virus influenzale può as-

sumere, sembrano costituire una caratteristica strettamente legata al tipo sierologico al quale il virus in questione appartiene, e non paiono poter essere sensibilmente modificati da influenze ambientali quali quelle da noi sperimentate. Ciò non significa naturalmente che non possa avvenire un passaggio dalla forma granulare a quella filamentosa o viceversa. Questo punto dovrà essere oggetto di successive nostre ricerche.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MOSLEY V. M., WYCKOFF R. W. G. - *Nature*, 157: 263 (1946).
 - (²) CHU C. M., DAWSON I. M., ELDFORD W. J. - *J. gen. Microbiol.*, 3: 298 (1949).
 - (³) BABUDIERI B., ARCHETTI I. - *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 12: 417 (1949).
 - (⁴) MURPHY I. S., BANG F. - *J. Exp. Med.*, 95: 259 (1952).
 - (⁵) ARCHETTI I. - *Arch. F. Ges. Virusf.*, 6: 1 (1953).
-