

2. ITALO ARCHETTI. — Il virus della malattia di Newcastle, visto al microscopio elettronico.

Riassunto. — L'A. espone i risultati ottenuti studiando con il microscopio elettronico tre ceppi del virus della malattia di Newcastle: i dati confermano la probabile forma rotondeggiante del virus.

Résumé. — L'A. expose les résultats obtenus par l'étude, au microscope électronique, de trois souches du virus de la maladie de Newcastle; ces résultats confirment pour le dit virus la forme plus ou moins ronde.

Summary. — The author describes the results of electron microscope observations on three strains of the virus of the Newcastle disease; these confirm that the virus has probably a nearly spherical shape.

Zusammenfassung. — Der V. legt die Ergebnisse dar, die er durch das Studium mit dem Elektronenmikroskop von drei Stämmen des Virus der Newcastle'schen Krankheit erzielte. Diese Resultate bestätigen, dass das genannte Virus eine etwa rundliche Form besitzt.

I dati che si hanno sulla probabile forma reale del virus della malattia di Newcastle dei polli (VMN), ottenuti mediante l'esame con il microscopio elettronico, sono tali da non lasciare molti dubbi sulla vera morfologia del virus: credo tuttavia utile riferire succintamente i risultati avuti nel nostro Istituto in una serie di ricerche iniziate proprio allo scopo di chiarire il problema morfologico del virus e che ora non vengono che a convalidare quanto altri AA. hanno ottenuto.

I primi ricercatori che studiarono VMN al microscopio elettronico: BANG (1), CUNHA e coll. (2), ELFORD e coll. (3), avevano concordemente notato nei preparati la presenza di forme filamentose, fago o spermasimili: accanto a queste vi era anche qualche forma rotonda, che invece predominava od era l'unica, quando la tecnica di preparazione del materiale da esaminare era diversa.

BANG (4, 5, 6) fu indotto da ciò a indagare quale fosse il motivo di tale differenza, che appariva, piuttosto che una realtà, come dovuta ad artifici dipendenti dai metodi usati: infatti l'A. concluse che VMN ha probabilmente una forma sferica e che tale è quando si trova nel liquido allantoide delle uova in cui viene coltivato. Il virus mantiene questa forma quando si trova in acqua o in soluzione fisiologica (0,8%), ma se la concentrazione

salina aumenta e la soluzione si fa quindi ipertonica, si originano le forme filamentose. Il virus può venire fissato in queste condizioni e conserva la forma acquisita anche se venga posto in acqua, mentre invece riprende la sua forma normale se non è stato fissato: è importante notare il fatto che durante questi cambiamenti di forma il virus non perde la sua virulenza.

ELFORD e coll. (7) confermarono i risultati di BANG e più recentemente DAWSON ed ELFORD (8) portarono un nuovo contributo che li convalida ancora maggiormente.

Questi AA., usando la tecnica dell'adsorbimento del virus su globuli rossi di pollo, emolizzati mediante la saponina e fissati con acido osmico 1 % dopo essere rimasti a contatto con il virus, riscontrarono nelle micro-fotografie la forma rotondeggiante delle particelle virali, portando quindi un nuovo elemento di evidenza per la supposizione che il pleomorfismo notato precedentemente sia unicamente il prodotto di artefatti e non abbia il suo corrispondente in natura.

Ricorderò che ELFORD e coll. (7) rilevarono nel loro studio la presenza di due distinte forme rotonde: una che si presenta come un corpo opaco e dà un'ombra ben definita con la metallizzazione, un'altra invece generalmente appiattita e con il centro lievemente sollevato. Le forme opache sarebbero costituite, secondo gli AA., da una sostanza mucosa, facilmente deformabile e osmoticamente sensibile, che durante i procedimenti di purificazione e di essiccamento si staccerebbe dalla particella virale, di cui sarebbe in un certo senso l'ombra.

BURNET e FERRY (9) hanno determinato mediante l'ultrafiltrazione che la grandezza del virus è compresa fra 80-120 m μ , ELFORD e coll. (7) hanno ottenuto con l'ultrafiltrazione un valore fra 90-140 m μ , con l'ultra centrifugazione fra 110-160 m μ ; con il microscopio elettronico, partendo da sospensioni in acqua o lievemente ipotoniche, di 150-50 m μ .

DAWSON e ELFORD (8), nei preparati allestiti secondo la tecnica riferita più sopra, ricavarono valori estremi di 140-270 m μ , con un valore medio di 193 ± 28 m μ .

Le mie ricerche sono state condotte su tre ceppi di VMN, di cui due isolati di recente nel nostro laboratorio dal prof. MAZZARACCHIO (ceppo VMN 1) e dal dott. D'AMORE (VMN 2); il terzo mi è stato gentilmente fornito dal prof. ZAVAGLI dell'Istituto Zooprofilattico Romano (VMN 3).

Tutti e tre i ceppi furono identificati come tali per il loro comportamento nell'embrione di pollo, per il loro potere emoagglutinante e per la capacità di riprodurre la malattia quando inoculati nel pollo. Non avendo a disposizione sieri antispecifici, non ho fatto le prove di neutralizzazione.

La tecnica seguita per la coltivazione è quella abituale: inoculavo 0,2 cc. del liquido infetto, diluito diversamente secondo il ceppo usato, nella cavità allantoidea di uova fecondate in decima giornata di incubazione e racco-

gliervo dopo 24-48 ore il liquido allantoideo, previo soggiorno delle uova per alcune ore in ghiacciaia onde evitare le emorragie.

Lasciavo i liquidi risultati positivi con il test di emoagglutinazione, in ghiacciaia a 4° C per una quindicina di giorni, in modo che la maggior parte delle sostanze mucoidi estranee precipitasse (CUNHA e coll.). Prima di procedere alla purificazione del materiale da esaminare, lo fissavo con acido osmico al 2% e poi seguivo presso a poco le norme consigliate da CUNHA e coll. (2). Solamente in pochi casi non ho fissato il virus.

Dopo una centrifugazione preliminare di 15' a 3000 gpm (giri per minuto primo) in una comune centrifuga, allo scopo di eliminare le particelle più grossolane, centrifugavo per 20' ad una velocità varia, oscillante sui 30.000 gpm (30.000 volte g), mediante l'ultracentrifuga. Risospendevo il centrifugato in acqua bidistillata, centrifugavo una seconda volta a 3000 gpm per 10' e nuovamente a 30.000 gpm per 20' per diverse volte, cambiando il liquido di sospensione onde purificare al massimo il virus.

I preparati allestiti secondo il procedimento solito, venivano metallizzati usando come sorgente il cadmio.

Ho provato ad ottenere la purificazione del virus anche con il metodo dell'adsorbimento, usando globuli rossi di pollo, che emolizzavo in acqua bidistillata pochi secondi prima della fissazione con acido osmico. Non ho avuto buoni risultati, poichè le particelle virali adsorbite non sono mai state molte: però confrontando le mie microfotografie (fig. 8) con quelle di DAWSON ed ELFORD (8), noto che anche questi AA., mentre ne hanno ottenute di magnifiche adsorbendo il virus influenzale non sono riusciti ad avere gli stessi risultati con VMN.

Le mie ricerche convalidano l'idea che VMN ha in natura una forma rotondeggiante e confermano la relativamente ampia varietà di grandezza delle particelle virali.

Ecco i valori ottenuti misurando il maggior numero di particelle possibile, appartenenti ad uno stesso ceppo e provenienti da una medesima preparazione:

	Valore minimo	Valore massimo	Valore medio	
VMN 1	98 m μ	278 m μ	177 $\pm$	34 m μ
VMN 2	111 m μ	278 m μ	214 $\pm$	38 m μ
VMN 3	167 m μ	306 m μ	220 $\pm$	42 m μ

Come si vede, le misurazioni differiscono notevolmente fra di loro sono una caratteristica del ceppo o sono dipendenti dalla tecnica di preparazione? Forse dall'uno e dall'altra insieme.

Non ho computato nei miei calcoli alcune forme giganti, che presentano

tutto l'aspetto del virus ma hanno un valore apparentemente molto elevato (362 e 368 $m\mu$): non è facile lo stabilire se tutto quanto noi vediamo nel campo del microscopio elettronico sia effettivamente riferibile al virus studiato, poichè è intuitivo che non si deve ritenere come virus tutto ciò che a parer nostro ha una forma simile a quella del virus stesso.

Come ELFORD e coll. (7) ho notato anch'io la presenza in alcune preparazioni di forme più opache, con ombra ben definita e di forme pianeggianti (figg. 1, 2, 3, 4). Studiando VMN 3, sia dopo come anche senza fissazione, ho riscontrato molte particelle virali come circondate da un sottile e regolare anello e con il centro della particella apparentemente sopraelevato rispetto alla porzione periferica, da cui sembra separato come da un solco (figg. 5, 6, 7).

Non entro in discussioni in merito a queste osservazioni e non avanzo alcuna ipotesi: troppo pochi sono i dati a mia disposizione; però ritengo che la diversità delle forme riscontrate non dipenda, come pensano gli AA. inglesi, dalla presenza o meno di un involucro mucoso, poichè nelle mie esperienze il materiale da esaminare venne quasi costantemente fissato.

Un cordiale ringraziamento al prof. Trabacchi per i suoi consigli e al dott. Castagnoli per l'assistenza tecnica nella esecuzione del lavoro.

Roma, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Microbiologia, 20 agosto 1949.

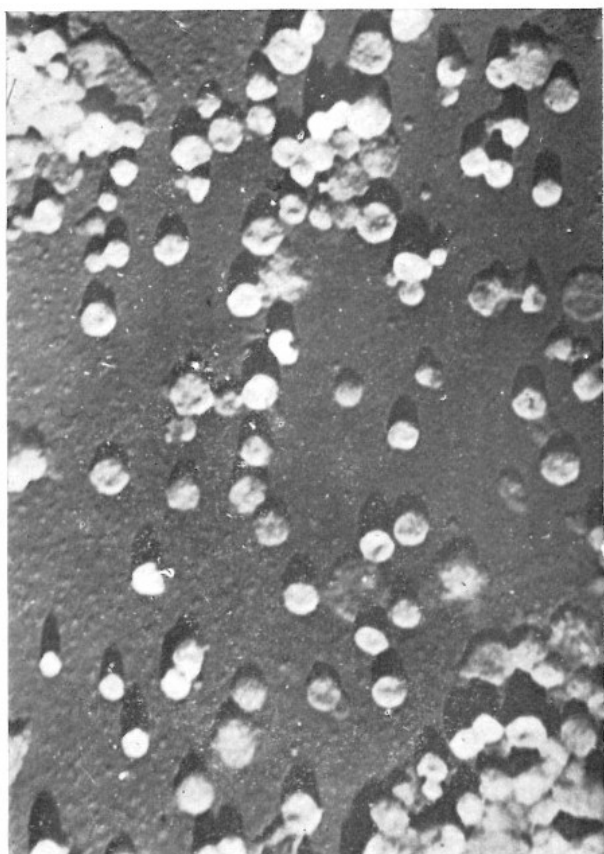


Fig. 1

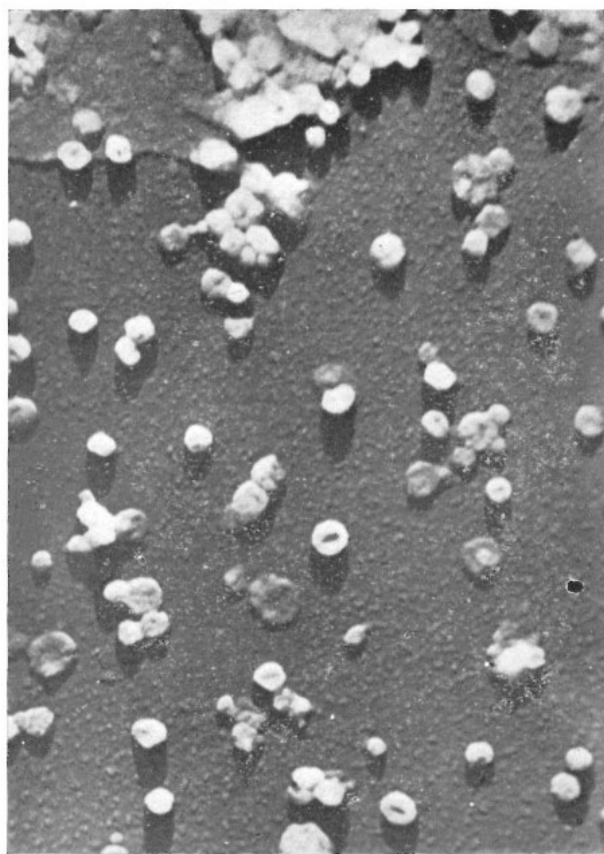


Fig. 2

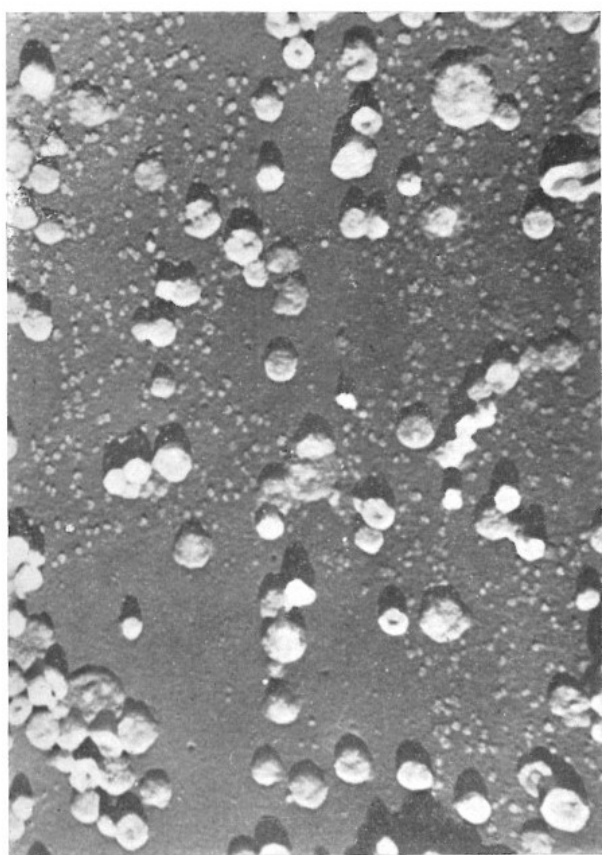


Fig. 3

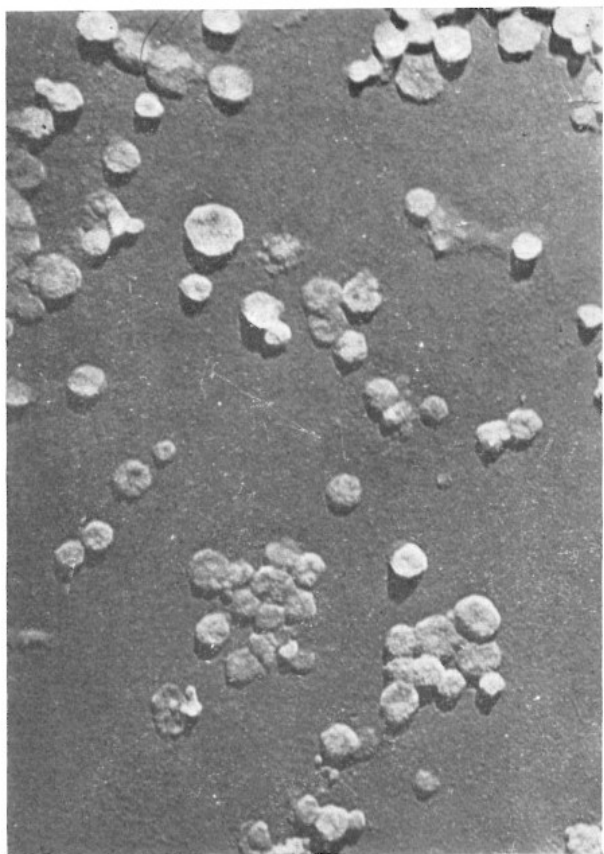


Fig. 4

Figg. 1 - 2 - 3 - 4 - Virus della Malattia di Newcastle : elementi di forma rotondeggiante e di grandezza variabile.

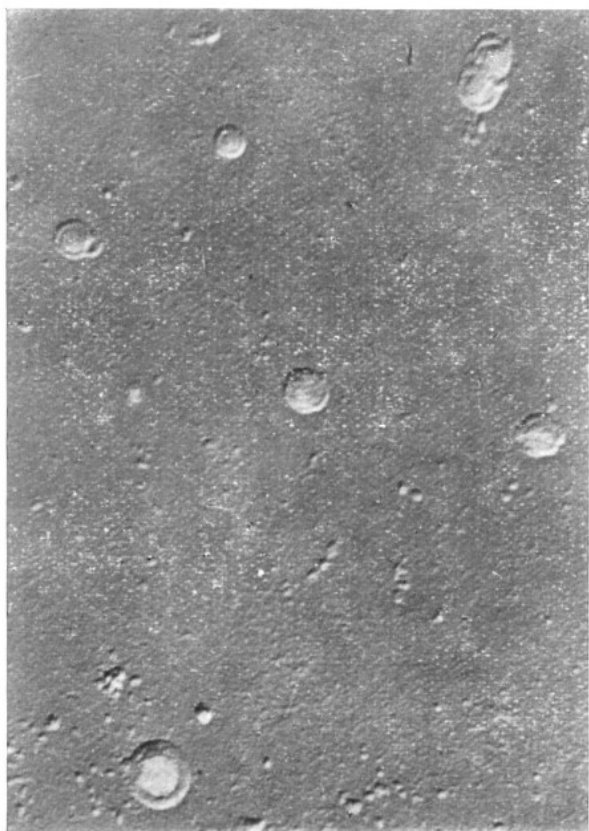


Fig. 5

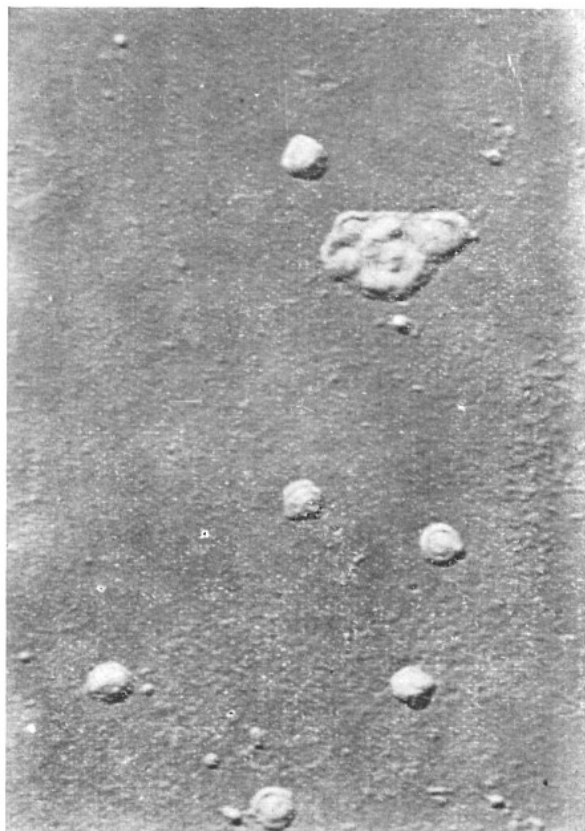


Fig. 6

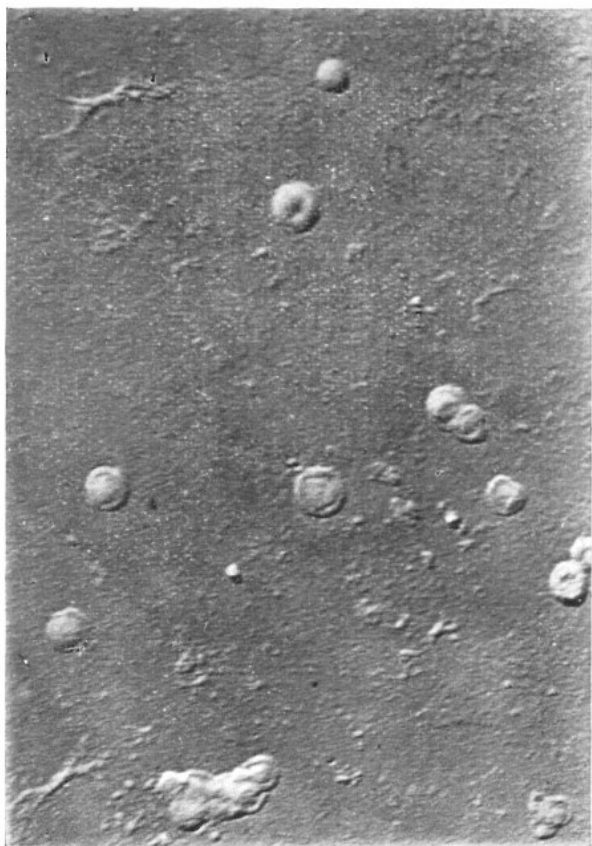


Fig. 7

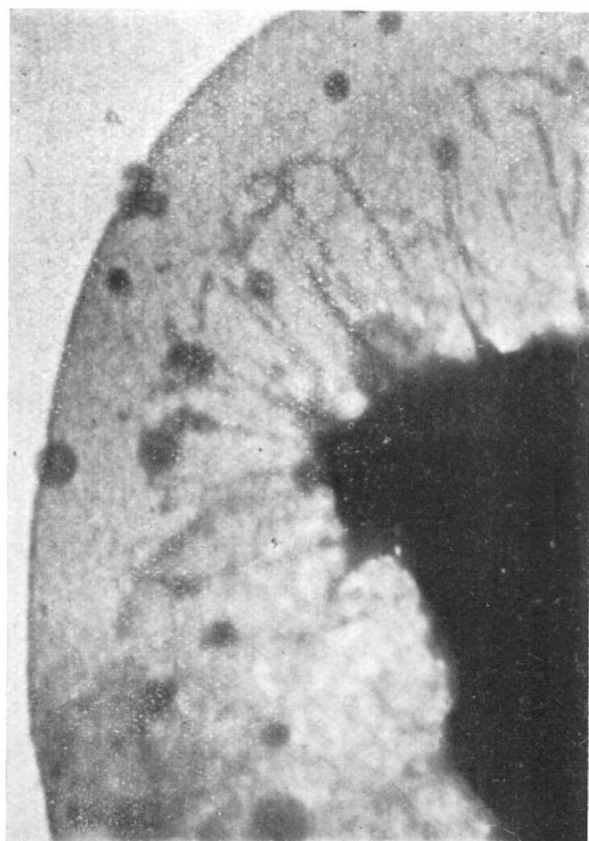


Fig. 8

Fig. 5 - 6 - 7 - Virus della Malattia di Newcastle: le particelle virali appaiono circondate da un sottile e regolare anello e con il centro della particella come sopraelevato rispetto alla porzione periferica.

Fig. 8 - Virus della Malattia di Newcastle - Particelle virali parzialmente adsorbite da globuli rossi di montone.

BIBLIOGRAFIA

(1) BANG F. B., Filamentous forms of Newcastle virus, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1946, 63, 5-7.

(2) CUNHA R., WEIL M. L., BEARD D., TAYLOR A. R., SHARP D. G. e BEARD J. W., Purification and characters of the Newcastle disease virus (California strain), J. Imm., 1947, 55, 69-89.

(3) ELFORD W. J., SMILES J., CHU C. M. e DUDGEON J. A., Electron micrographs of Staphylococcus bacteriophage «K» and the viruses of vaccinia and Newcastle disease, Bioch. J., 1947, 41, XXV.

(4) BANG F. B., Newcastle virus: conversion of spherical forms to filamentous forms., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1947, 64, 135-137.

(5) BANG F. B., Studies on Newcastle disease virus. III. Characters of the virus itself with particular reference to electron microscopy, J. exp. Med., 1948, 88, 251-256.

(6) BANG F. B., Formation of filamentous forms of Newcastle disease virus in hypertonic concentration of sodium chloride, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1949, 71, 50-52.

(7) ELFORD W. J., CHU C. M., DAWSON I. M., DUDGEON J. A., FULTON F. e SMILES J., Physical properties of the viruses of Newcastle disease, fowl plague and mumps, Brit. J. exp. Path., 1948, 29, 590-599.

(8) DAWSON I. M. e ELFORD W. J., The investigation of Influenza and related viruses in the electron microscope, by a new technique. I gen. Microb., 1949, 3, 298-311.

(9) DAWSON I. M. e FERY J. D., The differentiation of the viruses of fowl plague and Newcastle disease: experiments using the technique of chorio-allantois membrane inoculation of the developing egg, Brit. J. exp. Path., 1934, 15, 56-64.
