

34. B. BABUDIERI e I. ARCHETTI. — Isolamento del virus dell'attuale epidemia influenzale.

Riassunto. — Gli Autori riferiscono sull'isolamento di 5 ceppi di virus influenzale e ne descrivono le caratteristiche serologiche ed immunitarie.

Résumé. — Au cours de l'épidémie grippale dont Rome a été frappée pendant l'hiver 1948-49, les Auteurs ont isolé de l'homme 4 souches de virus grippal. Une cinquième souche a été isolée d'un furet spontanément infecté.

Ces cinq souches croissent facilement dans le liquide allantoïdien de l'embryon de poulet et donne une hémagglutination qui dépasse le titre de 1:1000. Il n'a pas encore été possible de l'adapter d'une façon constante à la souris.

Du point de vue sérologique, quatre de ces souches sont identiques entre elles, la cinquième est différente. D'après quelques essais préliminaires qui ont été faits il paraît, tout au moins dans le furet, qu'il n'existe aucune immunité croisée entre les deux types sérologiques.

Des essais d'inhibition de l'hémagglutination, effectués avec des sérums antigrippaux standard des types anti-A et anti-B, mettent en évidence une remarquable différence entre les souches isolées et les souches A et B classiques; des essais effectués avec des sérums de furets infectés expérimentalement avec les nouvelles souches montrent, tout au moins pour le groupe des quatre souches homogènes, qu'un lien de parenté existe entre elles et le virus grippal A.

Les sérums de convalescents contiennent une quantité très basse d'anticorps.

Les nouvelles souches ont été étudiées au microscope électronique, après adsorption aux hématies et centrifugation; à côté des formes sphériques classiques, elles présentent un haut pourcentage de formes filamenteuses.

Summary. — During the influenza epidemic which was prevalent in Rome in the winter months 1948-49, the AA. isolated from man four strains of influenza virus. A fifth strain was isolated from a ferret spontaneously infected.

These five strains grow with facility in the allantoïd liquid of the embryo of chicken and give a haemoagglutination above the titre 1:1000. It has not yet been possible to adapt them in a constant manner to the mouse.

269

From a serological viewpoint, four of the above strains are identical with one another, whereas the fifth is different. From some preliminary tests carried out, it seems that, at least in the ferret, no cross immunity exists between these two serological types.

Tests of inhibition of haemoagglutination, carried out with influenza standard sera against types A and B, show a notable difference between the strains isolated as above and the known A and B strains; some tests made with sera of ferrets experimentally infected with the new strains show, at least for the groups of the four homogeneous strains, that a relationship exists between them and the influenza virus A.

Sera of convalescent persons contain a very small proportion of antibodies.

The new strains were studied with the electron microscope, adsorption on red corpuscles and centrifugation having previously been effected. Besides the usual spherical forms, they show a high proportion of filamentous forms.

Zusammenfassung. — Im Laufe der Influenzaepidemie, welche Rom im Winter 1948-1949 befallen hat, haben die Verfasser vier Influenzavirustämme dem Menschen entnommen. Ein fünfter Stamm wurde von einem spontan infizierten Frettchen isoliert.

Die 5 Stämme entwickelten sich leicht in der Allantoisflüssigkeit des Hühnerembryo und weisen eine Hämoagglutination auf, die den Titer 1:1000 überschreitet. Es war noch nicht möglich sie in konstanter Weise der Ratte anzupassen.

Vom serologischen Standpunkt aus, sind vier der Stämme untereinander identisch, während der fünfte verschieden ist. Aus einigen einleitenden Versuchen scheint hervorzugehen, dass zumindestens im Frettchen, keine gekreuzte Immunität zwischen den 2 serologischen Typen besteht.

Mit Standard anti A und anti B Antiinfluenzaserum gemachte Hemmungsversuche der Hämoagglutination, weisen einen bemerkenswerten Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen und den klassischen Stämmen A und B auf. Versuche mit Serum von, mit neuen Stämmen experimentell infizierten Frettchen zeigen, zumindest für die 4 homogenen Stämme, eine Verwandtschaft zwischen diesen und dem Influenzavirus A.

Die Sera der Genesenden enthalten sehr geringe Mengen Antikörper.

Die neuen Stämme sind nach Adsorption an roten Blutkörperchen und Zentrifugierung, mit dem Elektronenmikroskop untersucht worden. Neben den klassischen runden Formen, weisen sie einen hohen Prozentsatz fadenähnlicher Formen auf.

Il 18 dicembre 1948 abbiamo iniziato, all'Istituto Superiore di Sanità, ricerche dirette ad isolare il virus dell'attuale epidemia influenzale ed a studiarne le caratteristiche immunitarie, anche in vista di un'eventuale produzione di vaccino. Esponiamo qui le ricerche fatte ed i risultati ottenuti.

Ci siamo procurato il liquido di lavaggio del naso-faringe di alcuni influenzati in I^a o II^a giornata di malattia, e dopo avervi aggiunta una piccola quantità di penicillina e di streptomina, abbiamo eseguito tre tipi di inoculazione: a) instillazione endonasale nel furetto in narcosi eterea; b) instillazione endonasale nel topino in narcosi eterea; c) inoculazione nel sacco amniotico di embrioni di pollo in 13^o giornata di incubazione. Non in tutti i casi sono state seguite tutte e tre tali vie: talvolta ci si è limitati ad una sola o a due di esse.

Nel caso del furetto, la temperatura rettale dell'animale venne giornalmente misurata, e quando essa divenne nettamente febbrile ed il furetto mostrò segni evidenti di malattia, esso venne sacrificato e ne furono prelevati sterilmente i polmoni e la mucosa nasale. Con poltiglia di questi organi furono inoculati topini e uova fecondate.

Anche nel caso dei topini, la temperatura rettale fu giornalmente misurata e l'animale fu sacrificato quando questa mostrò una brusca discesa sotto la norma. Anche qui furono sterilmente prelevati i polmoni, con i quali vennero infettati altri topini ed embrioni di pollo.

Le uova inoculate in amnio furono incubate per 48 ore a 37-38°, quindi aperte con cautele di sterilità: il liquido amniotico fu pipettato e raccolto in provette. Da ogni uovo fu prelevato un campione di liquido che fu controllato in agar ed in brodo per la sua sterilità, e che fu saggiato, a varie diluizioni (in genere 1:20, 1:40, 1:80) nella sua capacità di agglutinare una sospensione al 0,5% di emazie di pollo. In tutti i casi miscele più o meno ampie di liquidi amniotici furono inoculate endoamnio o endoallantoide, in nuove serie di uova. Mentre le uova per inoculazione endoamniotica venivano infettate in 13^o giornata d'incubazione, quelle per allantoidea lo erano in 10^o o 11^o.

Seguendo questo procedimento, il 31 dicembre fu possibile di ottenere una prima emoagglutinazione a basso titolo (1:20) dal liquido amniotico e da quello allantoideo di 5 uova appartenenti ad un medesimo gruppo. In un successivo passaggio, il 2 gennaio ottenemmo dalla quasi totalità delle uova inoculate, un'emoagglutinazione molto più evidente. Denominammo il ceppo così isolato « Roma 1 ». Altri 4 ceppi furono successivamente isolati i giorni 3 I (Roma 3), 8 I (Roma 2, Roma 4), 18 I (Roma 5).

Mentre i ceppi 1, 2, 3, 5, sono d'origine umana, quello 4 proviene da un furetto venuto spontaneamente a morte, con segni di broncopolmonite

influenzale, il 18 dicembre, cioè prima che venissero iniziate le attuali ricerche sull'influenza ed in ambiente in cui non veniva nè tenuto, nè manipolato materiale infettante. Risulta però che la persona addetta all'alimentazione dell'animale s'era ammalata pochi giorni prima d'influenza,

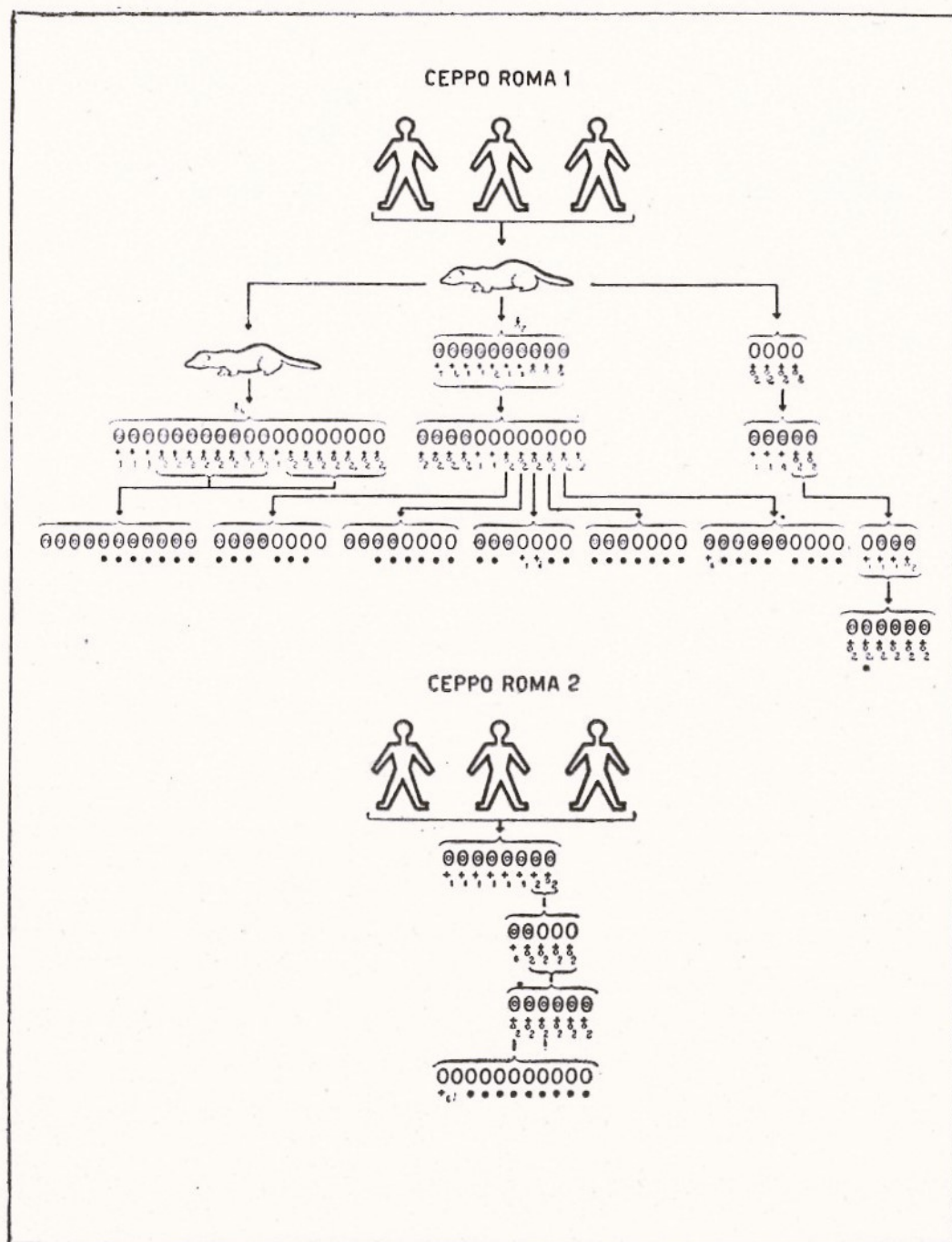


FIG. 1-a.

ed è quindi presumibile che il furetto si sia spontaneamente infettato da questa.

In vista di un'eventuale futura produzione di vaccino, i cinque ceppi isolati, mediante ripetuti passaggi furono tutti adattati a svilupparsi rigogliosamente nel liquido allantoideo, sì da dare in ogni caso un'evidente emoagglutinazione anche a titolo superiore all'1:1000, ed in un caso

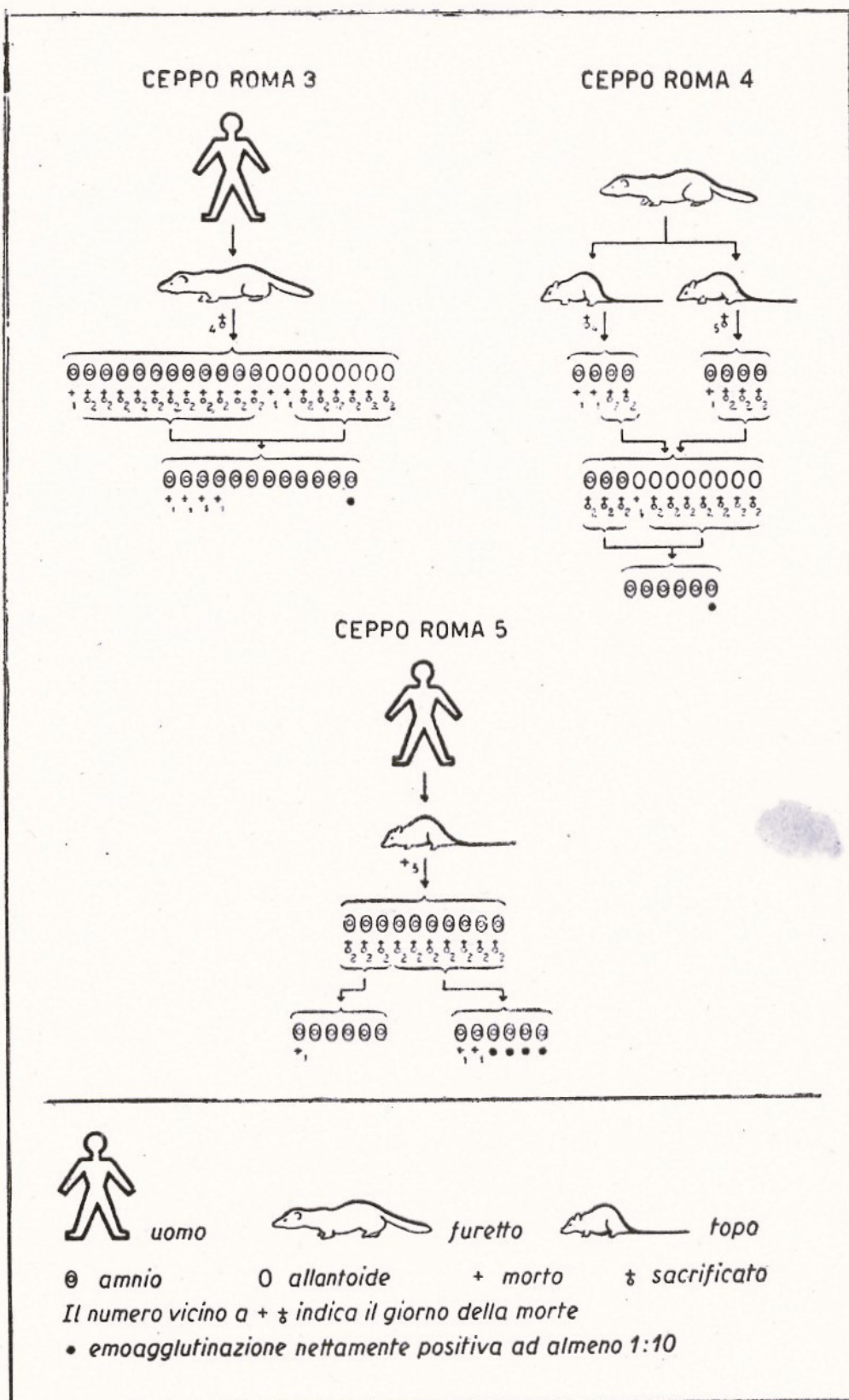


FIG. 1-b.

anche a 1:3200. Il solo ceppo « Roma 1 » si mantiene tuttora ad un titolo relativamente basso, che ad ogni modo supera quello di 1:100 e alle volte raggiunge anche quello di 1:1000.

Nel primo schema allegato sono rappresentati i passaggi eseguiti per arrivare all'isolamento dei ceppi e al loro adattamento al liquido allantoideo.

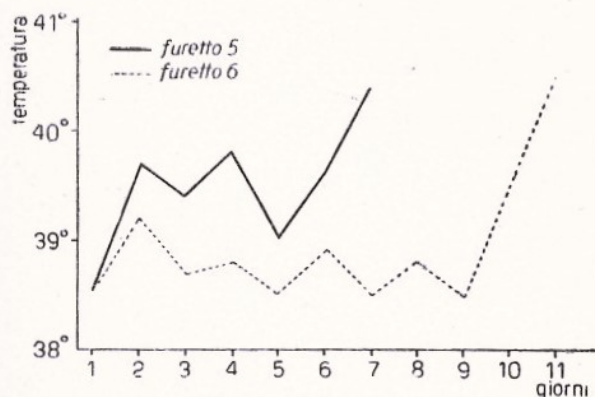


FIG. 2.

In complesso è da osservarsi che i furetti si sono infettati con grande facilità e che già in seconda o terza giornata hanno mostrato segni evidenti di malattia. I sintomi non sono stati però molto gravi ed i furetti che non sono stati sacrificati all'acme dell'infezione, hanno in genere superato agevolmente la ma-

lattia. In quelli sacrificati le lesioni broncopolmonari sono risultate sempre poco estese.

In qualche caso si è osservata la caratteristica seconda ripresa febbrile dopo una breve caduta della temperatura. Riportiamo nel grafico n. 2, due di tali casi.

Il materiale infettante di origine umana s'è mostrato nel primo saggio in complesso discretamente patogeno per il topolino. Un'alta percentuale di animali è venuta a morte od è stata sacrificata per evidenti ipotermia, nei primi 5 giorni dall'infezione. Nei passaggi successivi invece il virus appare attenuarsi e la mortalità ed i segni di

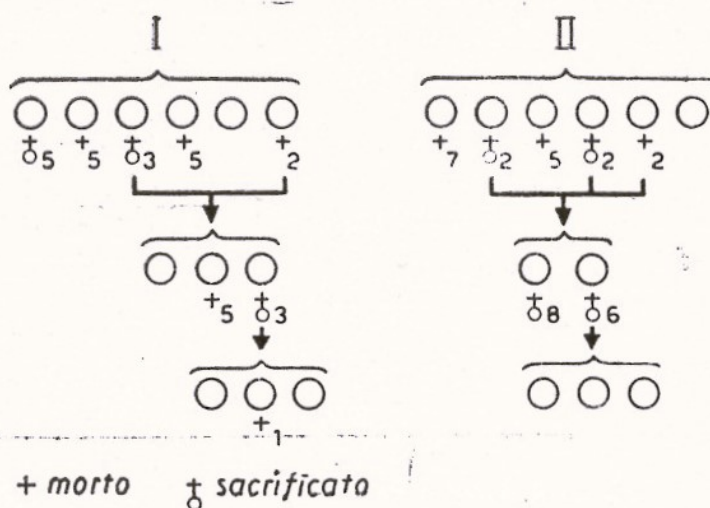


FIG. 3.

malattia da parte degli animali diminuiscono fino a scomparire. Riportiamo nello schema n. 3 il risultato di due di tali passaggi.

Dal primo passaggio attraverso al topolino è stato possibile isolare, con passaggi successivi nell'embrione di pollo, il virus: ciò non è più riuscito quando i passaggi attraverso il topolino erano divenuti due o più.

Nell'uovo lo sviluppo del virus è avvenuto con notevole facilità, tanto nell'inoculazione in amnios che in quella in allantoide, e dopo appena due-quattro passaggi l'agglutinazione è stata evidentissima.

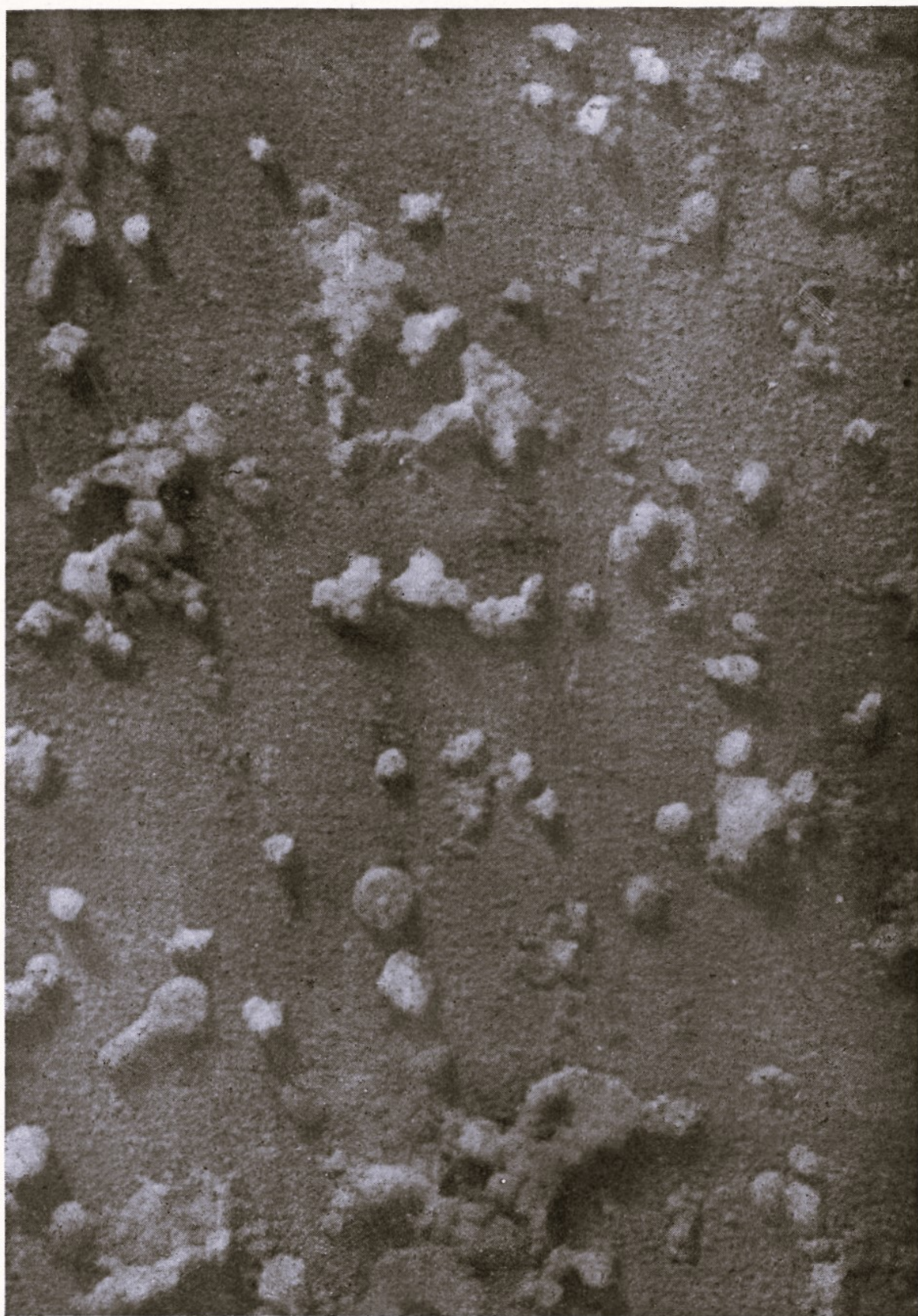


FIG. 4.



FIG. 5.

Il virus influenzale ripetutamente passato attraverso all'embrione, sembra accrescere la sua virulenza. Infatti un furetto infettato per via nasale con il ceppo « Roma 1 » (3 passaggi attraverso l'embrione) è venuto a morte con una bronco-polmonite emorragica massiva, in 6^a giornata, e di 8 topini tutti vennero a morte nei primi 5 giorni o furono sacrificati perchè in stato preagonico.

Allo scopo di avere un'ulteriore documentazione che l'agente che determinava l'emoagglutinazione fosse veramente il virus ricercato, abbiamo allestito alcuni preparati, sia del sedimento di liquido allantoideo centrifugato per un'ora a 13.000 (fig. 4), sia di emazie emolizzate di pollo, sospese per mezz'ora nel liquido allantoideo e successivamente centrifugate (fig. 5). I preparati sono stati osservati al microscopio elettronico ed hanno rivelato in ambedue i casi l'abbondante presenza di corpuscoli sferici aderenti alla membrana delle emazie e presentanti tutte le caratteristiche del virus influenzale. Caratteristica dei ceppi da noi isolati è l'abbondanza delle forme filamentose del virus.

Siamo passati quindi allo studio serologico dei ceppi isolati, servendoci dei sieri standard anti-A e anti-B fornitici dal Centro Mondiale per l'influenza di Londra, e allestendo con questi prove di inibizione dell'emoagglutinazione. Come controllo sono stati usati un tipico antigene A ed uno B, di alto titolo e specificità, pure fornitici da Londra. Come antigene abbiamo usato 4 volte la dose minima capace di dare ancora un'emoagglutinazione ben evidente in assenza di siero, contenuta nel volume di 0,1 cm³. Il siero è stato diluito scalarmente e messo nelle provettine nel volume di 0,5 cm³. La sospensione di emazie al 0,5% è stata aggiunta pure nel volume di 0,5 cm³. Le provettine sono state tenute a temperatura ambiente ed esaminate dopo mezz'ora.

Riportiamo qui i risultati di una di tali prove, prove che più volte eseguite, hanno dato risultati costanti:

A n t i g e n i						1: 40	1: 80	1:160	1:320	1:140	1:1280	1:2560	1:5120
<i>siero anti-A</i>													
A	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—
B	.	.	.	.	.	+	+	+	+	+	+	+	+
Roma 1	.	.	.	.	.	—	—	±	+	+	+	+	+
Roma 2	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	+	+
Roma 3	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	±	+	+
Roma 4	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	±	+	+
<i>siero anti-B</i>													
A	.	.	.	.	.	—	—	—	+	+	+	+	+
B	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—
Roma 1	.	.	.	.	.	—	—	±	+	+	+	+	+
Roma 2	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	—	+
Roma 3	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	+	+	+
Roma 4	.	.	.	.	.	—	—	—	—	—	—	+	+

Dalla tabella risulta che tanto il siero anti-A che quello anti-B hanno inibito pressochè allo stesso titolo l'emoagglutinazione provocata dai ceppi «Roma». Ciò indica che non ci troviamo di fronte nè ad un tipo d'influenza A del tipo classico, nè ad un tipo B, nè ad una miscela dei due tipi ⁽¹⁾.

Se però consideriamo l'intensità dell'inibizione che i due sieri hanno provocato nei quattro ceppi presi in esame, vediamo che mentre per tre ceppi (Roma 2, 3, 4) l'inibizione ottenuta ha raggiunto valori notevolmente elevati e tra di loro press'a poco corrispondenti; il ceppo «Roma 1» si è invece comportato in maniera del tutto diversa ed è stato inibito soltanto in minima misura.

Il ceppo «Roma 5», isolato più tardi e quindi non compreso nella tabella sopra riportata, è risultato presentare le caratteristiche dei ceppi 2, 3, 4.

Questa discordanza tra il ceppo «Roma 1» e gli altri, è stata confermata anche da una seconda prova di inibizione eseguita usando il siero di un furetto inoculato 22 giorni prima con il ceppo «Roma 3» e sopravvissuto all'infezione.

Antigeni					1:60	1:120	1:240	1:480	1:960	1:1920	1:3840	1:7680 (*)
<i>siero anti Roma 3</i>												
A	.	.	.	.	—	—	—	—	—	+	+	+
B	.	.	.	.	—	+	+	+	+	+	+	+
Roma 1	.	.	.	.	—	+	+	+	+	+	+	+
Roma 2	.	.	.	.	—	—	—	—	—	+	+	+
Roma 3	.	.	.	.	—	—	—	—	—	+	+	+
Roma 4	.	.	.	.	—	—	—	—	—	+	+	+

(*) Valori delle diluizioni finali.

Anche questa prova conferma che mentre i ceppi «Roma 2, 3, 4» (e 5) costituiscono un gruppo omogeneo, quello «Roma 1» è, dal punto di vista serologico, diverso.

Un'ulteriore conferma, seppure non del tutto decisiva, della diversità del ceppo «Roma 1» dagli altri, ci è stata data dai risultati della prova d'immunità crociata eseguita nel furetto, che qui esponiamo:

Un furetto è stato infettato per via endonasale con materiale del paziente da cui è stato isolato il ceppo «Roma 3». L'animale ha fatto

⁽¹⁾ Ricerche eseguite nel laboratorio del prof. Andrews a Londra, hanno dimostrato che i ceppi Roma 2-Roma 5 appartengono al tipo A, e più precisamente alla sua varietà comparsa in Europa dopo il 1947 (tipo A-1 degli americani). Questi ceppi corrispondono perfettamente a quelli che sono stati isolati da studiosi inglesi, francesi e olandesi nel corso dell'attuale epidemia. Il ceppo «Roma 1» è ancora allo studio.

una malattia tipica ed è quindi guarito. Il grafico n. 6 riporta la sua curva termometrica. Dopo sette giorni è stato nuovamente inoculato per via endonasale, con materiale proveniente da un influenzato. Il furetto non mostrò, com'era da aspettarsi, alcun segno di malattia, e soltanto una poco rilevante punta termica in prima giornata, da ritenersi non specifica (v. grafico n. 7). Dopo altri 20 giorni al furetto fu praticato un piccolo salasso e fu accertata nel suo siero la presenza di anticorpi inibenti per il ceppo « Roma 3 » fino al titolo di 1:1000 (titolo per « Roma 1 » - 1:60). Quindi l'animale fu inoculato per via endonasale con il ceppo « Roma 1 », passato ripetutamente attraverso l'embrione. L'animale questa volta ammalò con sintomatologia tipica, se pure non grave (sternuti) e con notevole ipertermia, se pure ritardata e di breve durata (vedi grafico n. 8).

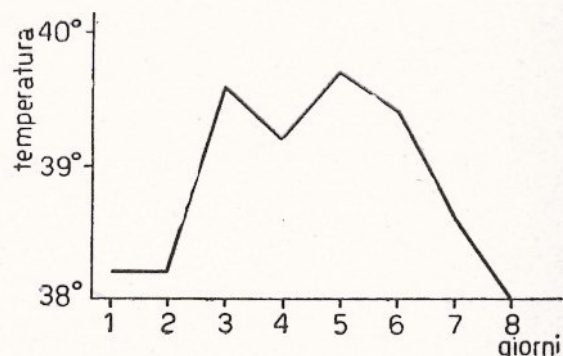


FIG. 6.

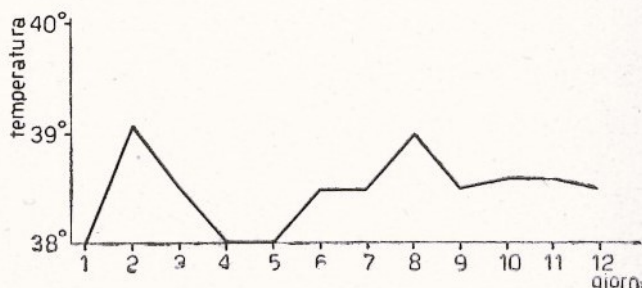


FIG. 7.

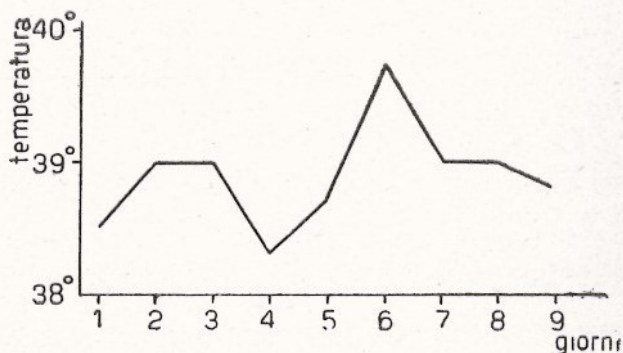


FIG. 8.

Da questi esperimenti si è cioè ricavata l'impressione che l'immunità data da un ceppo del gruppo « Roma 2-5 » dia soltanto una protezione limitata di fronte al ceppo « Roma 1 ». Naturalmente questa impressione abbisogna di ulteriori prove e conferme.

Un'altra prova serologica è stata fatta prelevando il siero di 3 persone che avevano superato da 20 a 40 giorni prima una tipica influenza (da una di queste persone è stato isolato anzi il ceppo « Roma 3 »).

Questi sieri sono stati controllati nel loro contenuto in anticorpi antiinfluenzali con il metodo dell'inibizione dell'emoagglutinazione. In tutti e tre i casi si è notata l'inibizione dell'agglutinazione per i tipi A e B fino ad un titolo poco elevato (diluizione finale del siero da 1:60 a 1:480 per il tipo A; la 1:60 a 1:120 per quello B). Il risultato inatteso è stato però quello che gli anticorpi per i ceppi « Roma » si sono rilevati più scarsi ancora ed hanno raggiunto in un caso appena il titolo di 1:120,

negli altri due neppure quello di 1:50. Non si può pensare che in questi casi i sieri provenissero da individui che non avevano superato una vera influenza o che si erano infettati con ceppi diversi da quelli dei ceppi « Roma », perchè appunto il siero del paziente da cui era stato isolato il ceppo « Roma 3 », ha inibito fino al titolo di 1:480 il tipo A, fino a quello di 1:120 il tipo B e non ha inibito neppure al titolo di 1:30 i ceppi « Roma », quello 3 compreso.

Il risultato appare paradossale e comunque debba essere interpretato, ci rivela che nell'uomo l'attuale epidemia influenzale sembra determinare uno stato immunitario di minima entità.

Questa circostanza e quella della probabile esistenza, nell'attuale epidemia, di ceppi tra di loro serologicamente diversi, possono spiegare il non raro ripetersi dell'infezione nella stessa persona a breve intervallo di tempo e giustificano d'altra parte il timore di una possibile futura riaccensione dell'epidemia, che ora sta declinando.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Microbiologia.
30 gennaio 1949.
