

72. B. BABUDIERI. — Isolamento e identificazione di un virus vaioloso nel corso dell'episodio epidemico verificatosi a Roma nel 1949.

Riassunto. — L'Autore isola a Roma nel corso dell'attuale episodio epidemico, due ceppi di virus vaioloso. Con ricerche sierologiche e con la prova di Paul, dimostra l'eziologia vaiolosa dei casi in questione. Le caratteristiche dell'episodio epidemico corrispondono a quelle dell'«alastrim».

Résumé. — Au cours d'un épisode épidémique de nature douteuse qui eut lieu à Rome en 1949, l'A. a isolé et étudié un virus varioleux. Son identification a été obtenue à la suite de plusieurs essais et réactions: d'inactivation du virus, de déviation du complément, de culture dans l'embryon de poulet; elle a été confirmée par la réaction de Paul et par la présence constatée des corps de Guarnieri. L'A. met en évidence l'inconstance assez fréquente des résultats obtenus par la réaction de Paul et conseille, dans les cas atypiques ou douteux de variole, d'avoir immédiatement recours à l'isolement du virus sur la membrane chorio-allantoïde et aux réactions sérologiques. A la suite de passages répétés à travers le lapin, le virus isolé a pris les caractéristiques du virus vaccin.

Summary. — During the epidemic, of a rather uncertain nature, which manifested itself in Rome in the year 1949, the A. isolated and investigated a smallpox virus. Its identification was obtained following various tests of virus inactivation, of complement fixation, of cultivation in chick embryos, and was corroborated by Paul's test and by the finding of Guarnieri's bodies. The A. calls attention to the often observed inconstancy of the results obtained from the latter test and recommends, in atypical or doubtful smallpox cases, to resort without delay to the isolation of the virus on the chorio-allantoic membrane and to the serological tests. After several passages through rabbits, the virus thus isolated assumed the characteristics of the vaccine virus.

Zusammenfassung. — Im Laufe einer epidemischen Episode ungewisser Natur, die im Sommer dieses Jahres in Rom stattgefunden hat, hat der V. ein Pocken-Virus isoliert und studiert. Die Identifizierung des Virus ist durch verschiedene Inaktivierungsproben, durch die Komplementbindungsreaktion und die Kultur in dem Hühner-Embryo erhalten worden, und ist durch Pauls' Reaktion und den Befund der Guarnierischen Körperchen bestätigt worden.

V. macht auf die unbeständigen Ergebnisse dieser letzten Reaktion aufmerksam, und rät, in atypischen oder zweifelhaften Pockenfällen, sogleich das Virus auf der chorio-allantoidischen Membrane zu isolieren und die serologischen Proben durchzuführen.

Durch wiederholte Kaninchenpassagen hat das isolierte Virus die Eigenschaften des Vaccine-Virus gewonnen.

Al primo sospetto della comparsa di una delle grandi malattie epidemiche, è di fondamentale importanza la diagnosi rapida ed esatta della malattia: un ritardo di giorni e alle volte di ore è sufficiente perchè dal primo localizzato focolaio il morbo possa diffondersi in maniera irrefrenabile causando molte vittime e danni economici incalcolabili.

Convieni di fronte ad un solo sospetto, prendere le misure profilattiche che s'addicono all'ipotesi più pessimistica, ma ciò non è purtroppo sempre possibile: troppi ostacoli sia di natura legale, che d'altro ordine, impacciano e spesso impediscono di prendere provvedimenti rigorosi davanti ad un semplice dubbio, non suffragato da una diagnosi sicura.

La scienza medica e più particolarmente la tecnica batteriologica si sono perciò da tempo preoccupate di mettere a punto metodi diagnostici che soddisfacessero a queste necessità, e in molti casi vi sono effettivamente riuscite. Purtroppo però i caratteri delle diverse epidemie non sono sempre costanti, mancano alle volte sintomi o reazioni ritenuti patognomonici, e allora la ricerca si fa difficile e complicata, e solo dal complesso dei dati raccolti da numerose e pazienti indagini si può trarre un criterio sicuro; è evidente che in tali casi una diagnosi rapida non è possibile.

Come esempio di quanto sopra, mi è parso interessante riferire sulle indagini svolte per chiarire la natura dell'episodio epidemico iniziato a Roma la fine del mese di febbraio 1949 e attualmente non concluso (*).

Il primo anello della catena epidemica è costituito da un vecchio mendicante ammalatosi di una forma diagnosticata come varicella, e ricoverato in un ospedale di Roma (**). In questo egli contagiò alcuni dei ricoverati e anche parte del personale d'assistenza. Da questo primo focolaio la malattia si è diffusa, ed ha dato luogo a numerosi altri focolai più o meno grandi che attualmente si cerca di circoscrivere e spegnere.

La prima diagnosi posta, come ho detto, è stata quella della varicella; ma fin dai primi casi di contagio, si affacciò necessariamente il sospetto di una diagnosi ben più grave: quella del vaiolo.

(*) Al momento della correzione delle presenti bozze l'episodio epidemico s'è spento da alcuni mesi.

(**) Indagini successive fanno ritenere che il primo caso di malattia si sia manifestato in un religioso proveniente dal Perù.

Non entro qui a descrivere in modo particolareggiato il decorso dell'epidemia ed il quadro clinico presentato dai pazienti; perchè questo sarà compito di altri. Mi limito soltanto a dire che se dal punto di vista epidemiologico si doveva propendere piuttosto verso il vaiolo (elevata contagiosità per gli adulti, maggiore frequenza nel sesso femminile), il criterio clinico lasciava piuttosto perplessi. Infatti accanto a casi che presentavano pustole numerosissime, confluenti, con la distribuzione tipica del vaiolo (figg. 1, 2), non mancavano altri casi che presentavano soltanto scarse pustole (fig. 3).

Anche quell'importante criterio differenziale fra vaiolo e la varicella che è costituito dal polimorfismo o meno delle manifestazioni cutanee non poteva essere qui preso in grande considerazione: accanto a casi che presentavano pustole tutte allo stesso stadio di sviluppo, ve ne erano alcuni, peraltro molto rari, in cui accanto a pustole già bene sviluppate, si vedevano piccole papule all'inizio della loro evoluzione.

Anche le condizioni generali dei pazienti erano molto migliori di quanto generalmente accada nel vaiolo. Inoltre nei casi guariti non erano residuati i caratteristici butteri.

La febbre, che in molti casi risaliva dopo la comparsa dell'esantema, e talvolta anche assumeva il tipo settico, in altri invece mancava o quasi durante il periodo eruttivo.

Di fronte all'incertezza del criterio clinico, era necessario rivolgersi al laboratorio per chiarire la natura della malattia.

Esiste una prova a cui in questi casi si ricorre: la prova di Paul e la consecutiva ricerca dei corpi del Guarniefi nella cornea del coniglio. Se positiva, essa permette in 2 o 3 giorni di accertare con sicurezza la diagnosi del vaiolo. E infatti questa prova fu eseguita dai primi che cercarono, con indagini di laboratorio, di accertare la natura dell'infezione. La prova diede risultato negativo.

E' noto però che la negatività della prova di Paul non esclude per nulla il vaiolo, e che anzi, mentre i primi ricercatori la trovarono positiva nella massima parte dei casi di Gins ⁽¹⁾ nell'80-90%), in tempi più recenti essa è risultata spesso negativa (Irons, Bohls, Hartman ⁽²⁾; North, Broben, Mengoni ⁽³⁾).

(1) H. A. GINS, Die Epidemiologie der Variola, Berlin (1935).

(2) J. V. IRONS, W. S. BOHLS e T. L. HARTMAN, Comparative susceptibility of embryonic chicks, chorionallantoic membranes and rabbits eye to variola virus, J. Bact., 41, 55 (1941).

(3) E. A. NORTH, J. A. BROBEN e A. H. MENGONI, The use of the chorioallantois of the developing chick embryo in the diagnosis of smallpox. Med. J. Austral., 1, 437 (1944).

Ho ritenuto perciò opportuno, non appena sono stato incaricato delle indagini del caso, di procedere ad altri esami, non trascurando nel contempo di ripetere la prova di Paul.

Nel frattempo ho allestito alcune altre ricerche per escludere la possibilità, molto improbabile del resto, che la forma in questione potesse identificarsi con il così detto « rickettsial pox » identificato nel 1946 da Huebner, Stamps e Armstrong ⁽⁴⁻⁵⁾ e di cui è stata descritta una piccola epidemia di oltre 100 casi a Nuova York. Questa infezione, trasmessa da un acaro del topino (*Allodermanyssus sanguineus* Hirst) è causata da una *Rickettsia* facilmente isolabile nella cavia o nel sacco vitellino dell'embrione di pollo (*Rickettsia akari*).

Ho prelevato perciò dalle pustole di alcuni pazienti un po' di materiale e, dopo averlo trattato con penicillina e streptomina, l'ho diluito in soluzione fisiologica ed inoculato nel sacco vitellino di una serie di embrioni in 7ª giornata, nonché nel peritoneo di topini e di cavie, e nel cervello di alcuni topini. I risultati sono stati però del tutto negativi. Gli animali inoculati non hanno mostrato alcuno dei sintomi caratteristici del « rickettsial pox », e la ricerca microscopica di rickettsie nei sacchi e nel peritoneo è risultata costantemente negativa. Di conseguenza l'ipotesi del « rickettsial pox » doveva venire scartata, e ci si doveva rivolgere alle prove riguardanti il vaiolo.

Esse sono state le seguenti:

ESAME MICROSCOPICO DEL CONTENUTO DELLE PUSTOLE

Con il contenuto delle pustole sono stati allestiti degli strisci che sono stati colorati ed esaminati al microscopio. Il pus conteneva globuli bianchi disfatti, detriti cellulari e stafilococchi. Questi ultimi sono stati anche isolati in cultura pura. La ricerca delle cellule giganti, caratteristiche della varicella, è stata sempre negativa.

Non m'è stato mai possibile di identificare nei preparati colorati, o al paraboloide, corpuscoli elementari. Però l'esame al microscopio elettronico del contenuto delle pustole, fissato e ripetutamente contrifugato,

(4) R. J. HUEBNER, P. STAMPS e Ch. ARMSTRONG, Rickettsialpox- a newly recognized rickettsial disease. - I. Isolation of the etiological agent, Pub. Health Rep., 61, 1605 (1946).

(5) R. J. HUEBNER, W. L. JELLISON e Ch. POMERANTZ, Rickettsialpox- a newly recognized rickettsial disease. - IV. Isolation of a *Rickettsia* apparently identical with the causative agent of rickettsialpox from *Allodermanyssus sanguineus*, a rodent mite. Publ. Health Rep., 61, 1677 (1940).

ha permesso di mettere in evidenza un numero piuttosto scarso di elementi morfologicamente simili al virus del vaiolo. A questa ricerca naturalmente non si può dare un grande valore, dato che il virus varicelloso ne è morfologicamente poco diverso.

ISOLAMENTO DEL VIRUS

Ho prelevato materiale da pustole di due pazienti in 10^a-12^a giornata e l'ho separatamente trattato con penicillina e streptomicina. Dopo 5 minuti ho diluito il pus e l'ho inoculato sulla membrana chorion-allantoidea di embrione di pollo in 11^a giornata. L'inoculazione è stata bene sopportata e scarsissimo è stato il numero degli embrioni venuti a morte.

Dopo 2 o 3 giorni le uova furono aperte e le membrane esaminate. Nella quasi totalità dei casi esse presentavano piccole chiazze opache disseminate, caratteristiche delle lesioni da virus. All'esame istologico l'epitelio della membrana appariva a tratti pluristratificato, con una ulcerazione centrale. Il chorion era edematoso e notevolmente infiltrato (fig. 6).

Il reperto istologico confermava l'eziologia da virus dalle lesioni. E' inoltre da notarsi che la necrosi centrale dei noduli è caratteristica soltanto per pochi virus, e che fra questi va annoverato quello vaioloso [Beveridge e Burnet (6)].

Con le membrane infette, triturate e sospese in soluzione fisiologica, è stato possibile eseguire con grande facilità passaggi successivi del virus. La totalità delle uova infettate mostravano in seconda giornata le caratteristiche lesioni descritte più sopra. Nelle lesioni non è stato possibile individuare corpi del Guarnieri.

Qual'è il valore diagnostico che dev'essere attribuito a questa estrema facilità di cultura del virus?

Secondo Buddingh (7); Markham e Bozalis (8); North, Broben e Mengoni (3) tale valore è grandissimo e tale da permettere di porre senz'altro la diagnosi di vaiolo, e infatti essi l'hanno usato a scopo diagnostico per differenziare casi atipici di vaiolo dalla varicella. Il virus varicelloso secondo questi Autori, come del resto anche secondo Beveridge e Burnet (6), non attecchirebbe sulla membrana chorion-allantoidea. Questa affermazione contrasta però con i dati pubblicati da De Castro Tei-

(6) W. I. B. BEVERIDGE e F. M. BURNET, The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo, Med. Res. Council, London (1946).

(7) G. J. BUDDINGH, Comparison of behaviour of neuro-testicular and dermal strain of vaccine virus in chorioallantoic membrane of chick embryo, Amer. J. Path., 12, 511 (1936).

(8) F. S. MARKHAM e G. S. BOZALIS, Chick embryo inoculation as a diagnostic aid in variola and varicella, J. Bact., 37, 656 (1939).

xeira ⁽⁹⁾; Tanigucki, Kogita, Hosokawa e Kuga ⁽¹⁰⁾, Caronia ⁽¹¹⁾, tutti Autori i quai riferiscono di aver coltivato sulla membrana tale virus. Ad ogni modo mi pare si possa senz'altro ammettere che il virus varicellioso, se è coltivabile sulla membrana, lo è con certa difficoltà. Quindi, anche se i risultati positivi da me ottenuti non si possono considerare senz'altro come probativi, tuttavia costituiscono un altro argomento piuttosto favorevole all'ipotesi del vaiolo. La mancanza dei corpi del Guarnieri nella lesione ha scarsa importanza. E' noto infatti che essi si osservano molto di rado nell'embrione [Beveridge e Burnet ⁽⁶⁾].

Ho tentato anche di vedere se mi riusciva di trasformare il virus isolato in virus vaccinico. A questo scopo due ceppi del virus sono stati inoculati per scarificazione cutanea, al coniglio. Com'era da attendersi, e come succede con il virus vaioloso, negli animali non si è avuta una evidente reazione locale. In collaborazione con il prof. Archetti ho allora eseguito due serie di passaggi del virus da coniglio a coniglio, utilizzando ogni volta una poltiglia preparata col tratto cutaneo dov'era stata praticata tre giorni prima l'inoculazione.

Dopo quattro di tali passaggi, in ambedue i casi apparvero sulle zone scarificate numerose pustole con il tipico aspetto delle pustole vacciniche.

PROVA DI DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO

Poichè è noto che l'antigene vaccinico ha le stesse caratteristiche sierologiche di quello vaioloso, è possibile usare nelle prove di deviazione del complemento, quale antigene, una sospensione di vaccino jenneriano. E' noto che il vaiolo, ed egualmente l'alastrim, determinano la comparsa nel siero di anticorpi devianti il complemento. E' però noto [Chang-chia-pin e Chen-yü-hsiang ⁽¹²⁾] che tali anticorpi son piuttosto fugaci e che rapidamente scompaiono dal siero.

Per preparare l'antigene sono partito da una linfa vaccinica non diluita con glicerina. L'ho sospesa in soluzione fisiologica e ne ho titolato il potere emolitico e quello anticomplementare. Ho visto che una

⁽⁹⁾ J. DE CASTRO TEIXEIRA, Infection de l'allanto-chorion de l'embryon de poulet par le virus de la varicelle, C. R. Soc. Biol., 121, 780 (1936).

⁽¹⁰⁾ T. TANIGUCHI, Y. KOGITA, H. HOSOKAWA e S. KUGA, A cultivation of the vaccinia and varicella viruses in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo; with special references to the preparation of the bacteria-free vaccine and prophylactic inoculation against varicella, Jap. J. exp. Med., 13, 19 (1935).

⁽¹¹⁾ CARONIA, Le più comuni malattie infettive acute, Vallardi, Milano (1946).

⁽¹²⁾ CHANG-CHIA-PIN e CHEN-YÜ-HSIANG, Lassen sich im Blut von Personen, welche echte Pocken überstanden haben, komplementbindende Antikörper nachweisen, Zschr. f. Immf. 31, 18 (1921).

xeira ⁽⁹⁾; Tanigucki, Kogita, Hosokawa e Kuga ⁽¹⁰⁾, Caronia ⁽¹¹⁾, tutti Autori i quai riferiscono di aver coltivato sulla membrana tale virus. Ad ogni modo mi pare si possa senz'altro ammettere che il virus varicellioso, se è coltivabile sulla membrana, lo è con certa difficoltà. Quindi, anche se i risultati positivi da me ottenuti non si possono considerare senz'altro come probativi, tuttavia costituiscono un altro argomento piuttosto favorevole all'ipotesi del vaiolo. La mancanza dei corpi del Guarnieri nella lesione ha scarsa importanza. E' noto infatti che essi si osservano molto di rado nell'embrione [Beveridge e Burnet ⁽⁶⁾].

Ho tentato anche di vedere se mi riusciva di trasformare il virus isolato in virus vaccinico. A questo scopo due ceppi del virus sono stati inoculati per scarificazione cutanea, al coniglio. Com'era da attendersi, e come succede con il virus vaioloso, negli animali non si è avuta una evidente reazione locale. In collaborazione con il prof. Archetti ho allora eseguito due serie di passaggi del virus da coniglio a coniglio, utilizzando ogni volta una poltiglia preparata col tratto cutaneo dov'era stata praticata tre giorni prima l'inoculazione.

Dopo quattro di tali passaggi, in ambedue i casi apparvero sulle zone scarificate numerose pustole con il tipico aspetto delle pustole vacciniche.

PROVA DI DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO

Poichè è noto che l'antigene vaccinico ha le stesse caratteristiche sierologiche di quello vaioloso, è possibile usare nelle prove di deviazione del complemento, quale antigene, una sospensione di vaccino Jenneriano. E' noto che il vaiolo, ed egualmente l'alastrim, determinano la comparsa nel siero di anticorpi devianti il complemento. E' però noto [Chang-chia-pin e Chen-yü-hsiang ⁽¹²⁾] che tali anticorpi son piuttosto fugaci e che rapidamente scompaiono dal siero.

Per preparare l'antigene sono partito da una linfa vaccinica non diluita con glicerina. L'ho sospesa in soluzione fisiologica e ne ho titolato il potere emolitico e quello anticomplementare. Ho visto che una

⁽⁹⁾ J. DE CASTRO TEIXEIRA, Infection de l'allanto-chorion de l'embryon de poulet par le virus de la varicelle, C. R. Soc. Biol., 121, 780 (1936).

⁽¹⁰⁾ T. TANIGUCHI, Y. KOGITA, H. HOSOKAWA e S. KUGA, A cultivation of the vaccinia and varicella viruses in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo; with special references to the preparation of the bacteria-free vaccine and prophylactic inoculation against varicella, Jap. J. exp. Med., 13, 19 (1935).

⁽¹¹⁾ CARONIA, Le più comuni malattie infettive acute, Vallardi, Milano (1946).

⁽¹²⁾ CHANG-CHIA-PIN e CHEN-YÜ-HSIANG, Lassen sich im Blut von Personen, welche echte Pocken überstanden haben, komplementbindende Antikörper nachweisen, Zschr. f. Immf. 31, 18 (1921).

diluizione al 10% era quella minima che poteva essere impiegata nelle prove.

Ho prelevato il sangue a 5 convalescenti, dei quali i tre primi avevano superato la malattia da una quindicina di giorni, i due ultimi da circa 40 giorni. I due ultimi erano stati, successivamente all'infezione vaccinati con esito debolmente positivo. Quindi i risultati ottenuti da questi due ultimi sieri sono da considerarsi con qualche riserva, per quanto sia noto che la vaccinazione jenneriana stimoli scarsamente la produzione di anticorpi devianti il complemento.

Come controllo ho usato un siero di vitello sano, ed un siero di vitello che circa un mese prima era stato usato per preparare vaccino jenneriano e che quindi doveva considerarsi fortemente immunizzato. Tutti i sieri sono stati inattivati.

La tecnica della prova è stata la seguente: in una serie di provette da reazione Wassermann, ho versato un cm³ di antigene, la quantità di complemento minimo necessario come risultato da una precedente titolazione, e 0,2 cm³ del siero in esame in diluizione scalari fino a 1:32.

La miscela è stata tenuta a 37° per 45'; quindi è stata aggiunta la miscela emolitica nella misura di 2 cm³ e le provette sono state rimesse in termostato per un'ora.

I risultati delle prove sono stati i seguenti:

	Diluizione del siero					
	1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
C.I	+	—	—	—	—	—
G.A	+	+	+	—	—	—
P.L	+	+	+	+	+	+
T.G	+	+	—	—	—	—
C.A	+	+	—	—	—	—
siero normale	—	—	—	—	—	—
siero immune	+	+	+	+	+	+

Nessuno dei sieri possedeva attività anticomplementare. La prova, nel II e III siero è stata nettamente positiva; meno netta, ma pur sempre positiva, lo è stata nel primo siero e nei due ultimi, provenienti da convalescenti di più vecchia data.

E' noto che la positività di queste reazioni viene considerata come un elemento decisivo di diagnosi. Infatti il siero dei varicellosi non devia il complemento in presenza di antigene vaccinico.

DOSAGGIO DEL POTERE VIRULICIDA DEL SIERO DI CONVALESCENTE

E' noto che nel siero di convalescente di vaiolo, compaiono anticorpi che sono capaci di inattivare in vitro il virus vaccinico. Messi in evidenza

già da Sternberg ⁽¹³⁾, la tecnica della loro ricerca, a scopo diagnostico, è stata successivamente messa a punto da Gins ⁽¹⁾.

La tecnica da me impiegata è stata la seguente: Una sospensione in soluzione fisiologica di linfa vaccinica, capace di dare nel coniglio, alla diluizione di almeno 1:20.000, un'evidente reazione cutanea, è stata messa a contatto a 37°, per 45', in parti uguali, col siero non diluito di tre convalescenti. Successivamente la miscela è stata diluita al 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, e una goccia di ciascuna diluizione è stata spalmata sul dorso, previamente scarificato, di una serie di conigli. I risultati, letti in terza giornata, sono stati i seguenti:

Sieri	Diluizioni del virus				
	1	1:10	1:100	1:1000	1:10.000
C.I	+	±	—	—	—
G.A	±	—	—	—	—
P.L	—	—	—	—	—
siero normale	+	+	+	+	+
siero immune	+	+	—	—	—

I risultati sono stati molto netti e l'inibizione del virus è stata in ogni caso ben evidente. Se si confrontano questi risultati con quelli ottenuti nella prova di deviazione del complemento, si vede che esiste una perfetta corrispondenza. I sieri che più intensamente deviano, danno anche la più evidente inattivazione del virus vaccinico. In conclusione questi risultati confermano in pieno quelli delle prove precedenti.

Questa prova è stata ripetuta una seconda volta, impiegando però come terreno rivelatore anzichè la cute del coniglio la membrana chorio-allantoidea dell'embrione di pollo.

E' stata preparata la solita miscela di vaccino-siero, con aggiunta inoltre di penicillina e streptomina. Dopo 45' di incubazione, la miscela è stata inoculata in 4 uova per ciascun siero. Un solo uovo venne a morte dopo 24 ore; gli altri furono aperti in seconda giornata, e le membrane furono accuratamente esaminate.

I risultati sono esposti nella tabella seguente. E' da notarsi che nella valutazione della positività o meno del risultato, non s'è tenuto conto della presenza, al punto d'innesto, di lesioni di dubbia specificità, ma che si son ricercate le caratteristiche chiazze opache rotondeggianti:

⁽¹³⁾ STERNBERG, Wissenschaftliche Untersuchungen über das spezifische Infektionsagens der Blattern und die Erringung künstlicher Immunität gegen die Krankheit, Zbl. f. Bakt. Orig., 19, 805 (1896).



Fig. 1 - *Vaiolo*. Diffusa eruzione pustolosa.



Fig. 2 - *Vaiolo*. Diffusa eruzione pustolosa.



Fig. 3 - *Vaiolo*. Scarsa eruzione pustolosa.



Fig. 4 - *Vaiolo*. Inizio della formazione di croste. Alcuni elementi sono emorragici.



Fig. 5 - *Vaiolo*. Caso guarito. Residuano chiazze di depigmentazione.

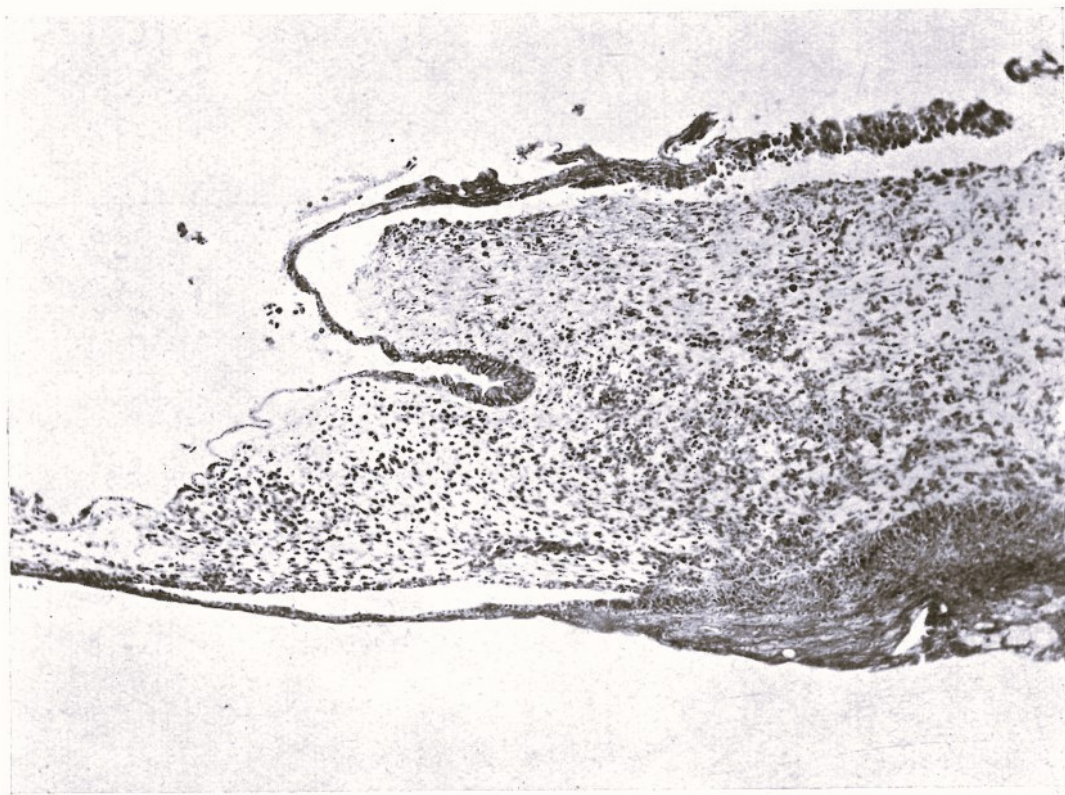


Fig. 6 - Membrana chorion-allantoidea infettata con virus vaioloso. Prolifera-
zione e edema del chorion. Zenker, ematossilina Carazzi, eosina, 70x.

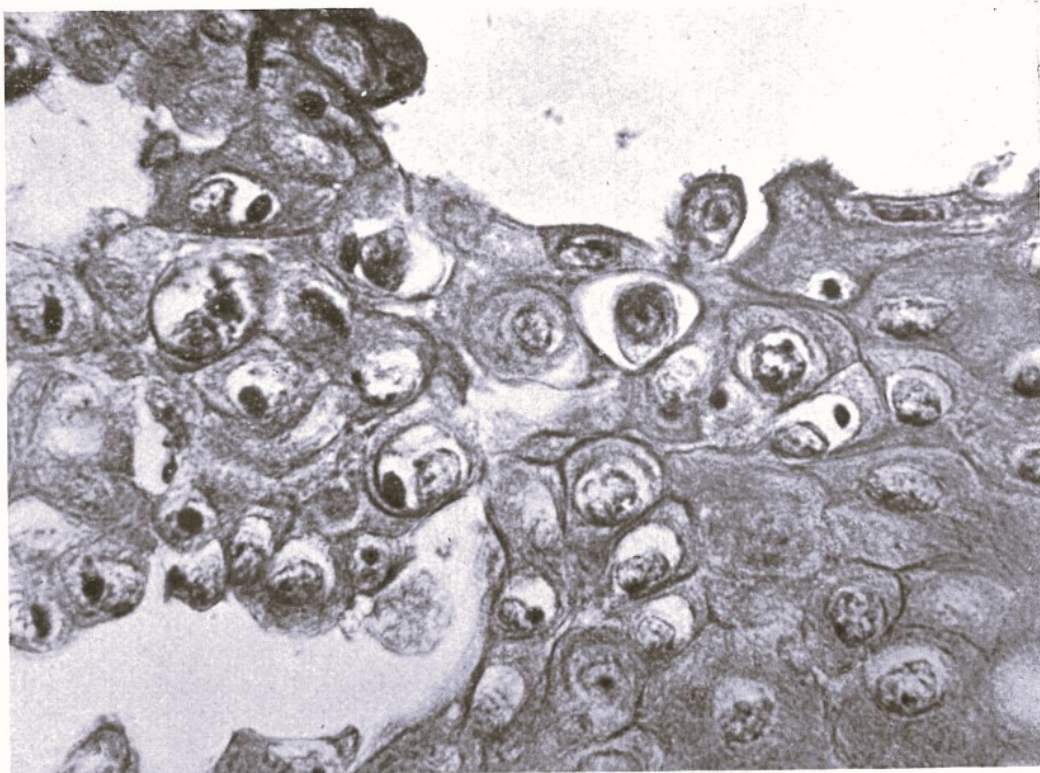


Fig. 7 - Corpi del Guarnieri nella cornea del coniglio. Sublimato alcoolico, ematossilina ferrica di Heidenhein-eosina 800x.

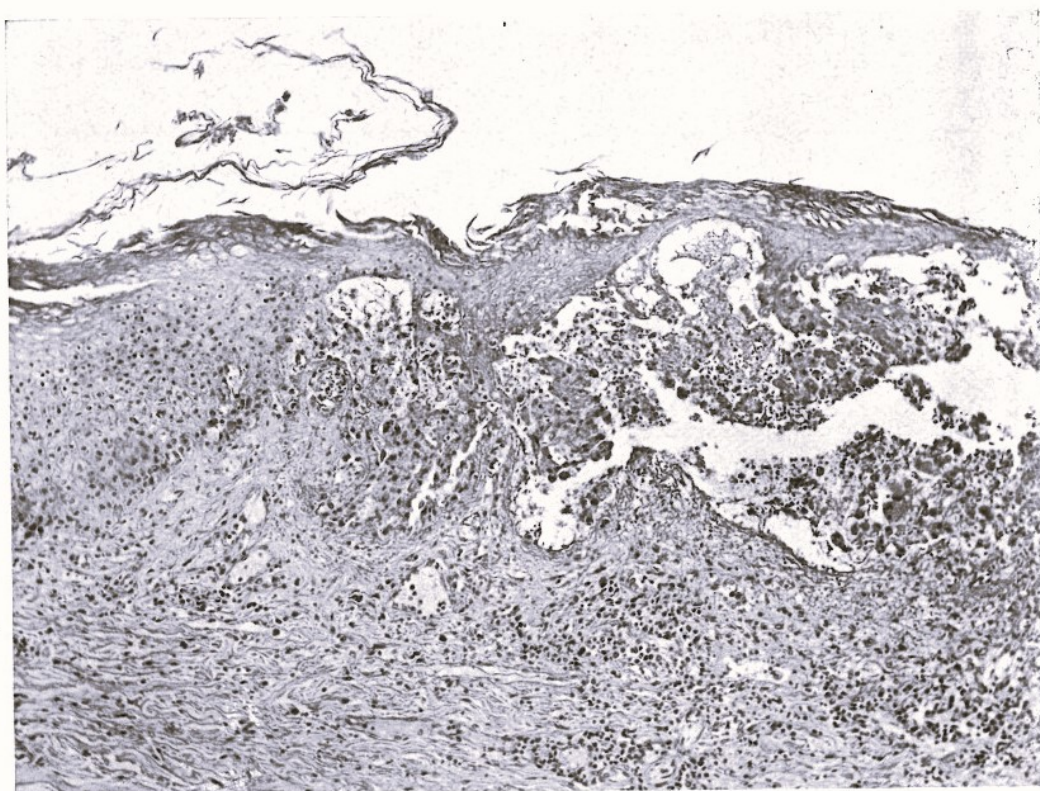


Fig. 8 - Pustola in un caso mortale di vaiolo, Zenker, ematossilina Carazzi-eosina 70x.

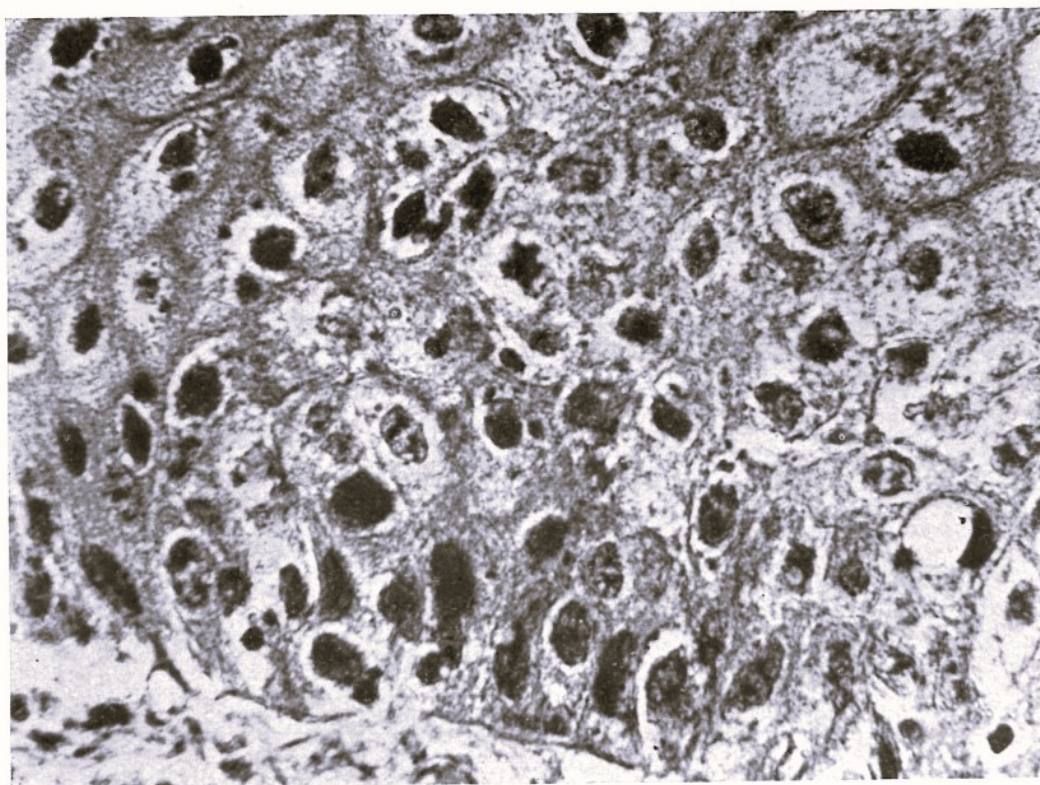


Fig. 9 - Corpi del Guarnieri nelle cellule dell'epidermide. Caso umano mortale. Zenker, ematossilina ferrica di Heidenhein, eosina 800x.

Sieri	Uova inoculate			
	1	2	3	4
C.I	+	+	—	—
G.A	+	+	—	—
P.L	+	—	—	—
siero normale	+	+	+	—
siero immune	+	—	—	—

I risultati qui sono stati meno netti, fors'anche per l'alta virulenza del vaccino impiegato; ad ogni modo però anche così è stato possibile di mettere in evidenza anticorpi virulicidi. Anche qui il risultato più netto, così come nelle altre prove, è stato dato dal siero di P. L.

PROVE DI INATTIVAZIONE DEL VIRUS ISOLATO,
CON SIERO IMMUNE ANTIVAIOLOSO

Usando la tecnica sopra esposta, e partendo da una poltiglia di membrane inoculate con uno dei ceppi da me isolati dai pazienti (V-1), ho allestito una prova di potere virulicida da parte di un siero immune di vitella, sia non diluito che diluito a 1:10. Come controllo, oltre che un siero normale ho usato anche sieri di convalescenti. Con ogni miscela sono state inoculate 5 uova.

Sieri	Uova inoculate				
	1	2	3	4	5
Siero immune	+	—	—	—	—
siero immune 1:10	+	—	—	—	—
siero normale	+	+	+	+	+
C.I	+	—	—	—	—
G.A+P.L	+	—	—	—	—

Come si vede, anche questo risultato è nettissimo, e dimostra che un siero anti vaioloso di vitello, di un animale cioè che non può possedere anticorpi per il virus varicelloso, inattiva il virus da me isolato, che di conseguenza non può essere che quello vaioloso.

PROVA DI PAUL E RICERCHE DEI CORPI DEL GUARNIERI

Come ho già detto, le prime prove avevano dato ad altri risultato negativo. Le prove sono state però ripetute, e dopo aver avuto risultati negativi in oltre 5 casi, alla fine, quando le altre prove erano ormai concluse ho avuto risultato nettamente positivo in 2 casi. La reazione macroscopica è stata piuttosto tardiva: essa cominciò ad essere visibile in seconda giornata, ma diventò meglio evidente in terza. Nelle

sezioni praticate la ricerca dei corpi di Guarnieri fu positiva; scarsi in uno dei due casi erano invece molto abbondanti nel secondo (fig. 7).

Corpi del Guarnieri furono da me trovati anche nella cute di un paziente venuto a morte per la malattia (fig. 9). Il loro reperto veniva a porre il suggello finale alla positività delle altre ricerche.

Il risultato ripetutamente negativo di questa prova, ci insegna che non bisogna mai fermarsi alle prime prove, ma che bisogna insistere in queste, perchè talvolta solo così facendo si può finalmente trovare il caso che dà un risultato bene evidente.

Concludendo i risultati di queste ricerche escludono l'ipotesi della varicella, e confermano quella del vaiolo.

Naturalmente, nel termine di vaiolo comprendo anche quello di alastrim, malattia che ormai viene considerata come una varietà di vaiolo, e il cui virus si comporta, dal punto di vista sierologico, esattamente come quello vaioloso ⁽¹⁴⁾. La distinzione tra alastrim e vaiolo lieve non è facile, talvolta impossibile. Ad ogni modo nell'epidemia di Roma la gravità delle manifestazioni cutanee in contrasto con lo stato generale relativamente buono, la scarsa mortalità, l'assenza di butteri e soprattutto la positività della vaccinazione jenneriana in una certa percentuale di convalescenti, sono tutti elementi che ci fanno propendere per l'alastrim piuttosto che per il vaiolo. L'epidemia romana presenta in ciò una notevole somiglianza con quella pure di alastrim che nel 1921 ha colpito la Svizzera, e che nel 1922 s'è diffusa in Inghilterra. La sua diffusione in una popolazione che possessa una discreta immunità di base, non può essere molto ampia, ed è da sperare che con opportuni provvedimenti d'isolamento, e soprattutto con la vaccinazione in massa, la si possa rapidamente dominare ed estinguere.

(14) G. SOBERNHEIM, Variola und alastrim, 13^o Tagung d. D. Vereinig. f. Mikrobiol., Bern. (1928); Zbl. f. Bakt. I Orig., 110, 97, 119 (1929).