

76. F. MULÈ. — Tentativi d'identificazione del virus della poliomielite al microscopio elettronico.

**Riassunto.** — Ricerche eseguite al microscopio elettronico sulla cultura del sangue proveniente da ammalati di m. di Heine-Medin (forma letale) hanno messo in evidenza corpuscoli elementari dalle dimensioni oscillanti tra 25  $\mu$  e 250  $\mu$  con una media di 100  $\mu$ .

Nei due stipiti esaminati, in uno (stipite A) gli elementi osservati sono regolari come forma e dimensione; mentre nel secondo (stipite B) i vari elementi hanno forma e dimensione irregolare, sebbene tutti tendano alla sferica.

E' stata osservata una forma filamentosa direttamente nel sangue (stipite A), e forme allungate in cultura (stipite B).

**Résumé.** — Les recherches exécutées à l'aide du microscope électronique sur la culture du sang provenant des malades du mal Heine-Medin (forme mortelle) ont mis en évidence des corps élémentaires de dimension qui oscille entre 25  $\mu$  et 250  $\mu$  avec une moyenne de 100  $\mu$ .

Les éléments de l'une des souches (A) examinées sont réguliers en ce qui concerne leur forme et leur grandeur, tandis que les différents éléments de la seconde souche (B) ont une forme et des dimensions variées, bien que tendant tous vers la forme sphérique.

On a pu observer directement dans le sang (souche A) une forme filamenteuse et des formes allongées en culture (souche B).

**Summary.** — Researches carried out by means of the electronic microscope upon blood of 2 cases, died from Heine-Medins disease, showed that the dimensions of elementary corps oscillate between 25 and 250 millimicron, with an average value of 100 millimicron.

In the two examined strains in one (type A) the elements observed showed regular shapes and dimensions, while the second one (type B) showed such of irregular type and dimensions, although all of them had a tendency to be sphaerical.

Filament-like forms were obtained directly from blood (strain A) and oblong-shaped ones from cultures (type B).

**Zusammenfassung.** - Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Blutkulturen von zwei an der Heine-Medinschen Krankheit gestorbenen Patienten zeigten, dass die Grösse des elementarsskirprs zwischen 25-250 millimikron liegt, mit einem Durchschnittswert von 100 millimikron.

Bei den zwei untersuchten Stämmen waren die Elemente des Stammes A von regelmässiger Form und Abmessung, während die Elemente des Stammes B unregelmässige Formen aufwiesen, obwohl alle mehr oder minder Kugelförmig erschienen.

Aus dem Blute wurde eine fadenförmige Art isoliert (Stamm A) und aus der Kultur wurden längliche Formen gezogen (Stamm B).

---

Lo studio del virus poliomielitico è stato tentato al microscopio elettronico da vari ricercatori.

GARD (1), in preparazioni di virus poliomielitico umano e murino (Theiler ed. Sk) ha descritte forme filamentose, che sono state riscontrate anche da BOURDILLON (2) nel virus poliomielitico murino.

Il virus poliomielitico tipo Lansing, patogeno per il ratto cotonoso, il topo e la scimmia, è stato osservato da LORING, MARTON, e SCHWIRDT (3). Le immagini da essi ottenute, con o senza proiezioni di oro, hanno l'aspetto di fini corpuscoli asimmetrici, le cui dimensioni, calcolate dall'aspetto delle ombre, sono tra 15  $\mu$  e 35  $\mu$  con un valore medio di 25  $\mu$ . Essi non hanno riscontrato forme filamentose.

REAGAN, SCHENK e BRUECKNER (4) in ricerche eseguite al microscopio elettronico sul midollo spinale di scimmie infettate con virus poliomielitico (stipite Brunhilde) hanno visto che il virus ha un aspetto sferico alquanto asimmetrico avendo un diametro intermedio tra i 20  $\mu$  ed i 50  $\mu$ . Gli AA. hanno anche descritto forme filamentose. Gli elementi sferici somigliano a quelli già descritti per lo stipite LANSING (3), e non si riscontrano nel midollo spinale di scimmie normali sottoposto allo stesso procedimento di preparazione ed osservazione.

Nello studio da noi condotto, di cui riferiamo i risultati, ci siamo serviti di due stipiti di virus poliomielitico prelevati direttamente dal sangue di ammalati ricoverati in clinica per forma grave ascendente di malattia di Heine-Medin e deceduti dopo breve tempo dal ricovero.

La diagnosi clinica venne sempre confermata dall'esame autoptico.

Per semplicità di esposizione chiameremo i due stipiti da noi presi in considerazione rispettivamente A B.

Lo stipite A proviene da una donna pervenuta alla nostra osservazione in II giornata di malattia con paralisi flaccida degli arti superiori, inferiori, e dei muscoli del tronco.

Il sangue venne prelevato dalla vena della piega del gomito nella quantità di 10 cc. e seminato in provettoni contenenti 50 cc. di brodo di carne e stilbestrolo (1  $\gamma$  per cc.) e poi coperto con 3 cc. di olio di uliva.

Dopo incubazione a 37° per 72 ore vennero prelevati 5 cc. del liquido immediatamente a contatto con l'olio; con questo materiale vennero allestiti dei preparati per l'osservazione elettronica, lavando ripetutamente in acqua bidistillata, e centrifugando per 15 minuti a 10.000 giri al minuto. Dall'ultimo sedimento, sospeso in 2 cc. di acqua bidistillata, venne prelevata un'ansata e posta sulla membrana di collodio portaoggetti.

Dopo che i preparati erano asciutti, venivano ombrati con vapori di cromo (5) e si procedeva quindi all'osservazione con il microscopio elettronico dell'Istituto Superiore di Sanità (6), con ingrandimento di 18.000 d.

Nella figura N. 1 si vede la superficie di un globulo rosso sulla quale si notano piccoli elementi in rilievo, singoli ed ammassati; nella figura N. 2 si vede un globulo bianco, il cui protoplasma, che occupa la parte centrale della figura, è trasparente, mentre ai lati di esso i nuclei appaiono opachi: al centro del protoplasma, un elemento sferico singolo, rilevato.

La figura N. 3 ritrae il nucleo di un globulo bianco sul quale si notano diversi elementi sferici rilevati di varia grandezza; nella figura N. 4 si nota una forma filamentosa il cui stroma appare corpuscolato.

Il materiale da cui vennero fatti i prelievi per queste osservazioni, venne mantenuto a 37° ancora per un mese, dopo di che vennero prelevati 5 cc. di liquido dalla parte più direttamente a contatto con l'olio di ulivo, e sottoposti allo stesso procedimento di concentrazione ed osservazione elettronica dei preparati osservati prima.

Nella figura N. 5 e N. 6 si notano numerosi elementi di forma tendente alla sferica di grandezza varia; la figura N. 7 mostra questi stessi elementi ammassati.

Con il materiale servito per le ricerche elettroniche, vennero inoculate due scimmie *macacus rhesus* per via intracerebrale. Tutte e due ebbero rialzo febbrile; la temperatura si mantenne per otto giorni sui quaranta gradi, al nono giorno dall'inoculazione una delle due scimmie presentò una forma paralitica fulminante, e venne a morte dentro 24 ore; l'altra guarì.

All'esame autoptico della scimmia deceduta si notò una intensa congestione di tutto il sistema nervoso centrale con i segni manifesti di una poliomielite diffusa; il reperto macroscopico venne confermato dall'esame istologico.

Il virus B proviene da un bambino di due anni pervenuto alla nostra osservazione in V giornata di malattia. La sindrome paralitica si era iniziata dopo due giorni di febbre, ed aveva acquistato un carattere evolutivo ascendente rapidissimo e molto grave.

Portato alla nostra osservazione, il bambino peggiorò continuamente, così che fu necessario, dopo qualche ora dall'ingresso, metterlo nel respiratore artificiale ove morì. L'esame autoptico mostrò i segni evidenti di una grave poliomielite diffusa.

Il sangue prelevato all'ingresso subì lo stesso trattamento descritto per il virus A.

Non ci fu possibile in questo secondo caso l'osservazione elettronica dopo i primi giorni di incubazione del sangue, per cui i reperti si riferiscono all'osservazione eseguita dopo trenta giorni di incubazione. I preparati vennero eseguiti secondo la stessa tecnica adoperata per il virus A.

Nella figura N. 8 e N. 9 si osservano vari elementi, singoli ed ammassati di grandezza varia, di forma per la maggior parte sferica; soltanto al centro della figura N. 8 si notano due forme allungate.

Nella figura N. 10, si nota tra due elementi distinti, sferoidali, di grandezza diversa, un singolo elemento allungato.

Con il materiale utilizzato per le ricerche elettroniche vennero inoculate due scimmie *macacus rhesus*. Queste, dopo l'inoculazione, presentarono elevazione della temperatura (40-40,5); al decimo giorno dall'inoculazione in una di esse la temperatura si abbassò di un grado e comparve paresi degli arti posteriori, a cui fece seguito paralisi generalizzata e morte in 24 ore.

All'esame autoptico si notò: congestione generalizzata di tutto il sistema nervoso centrale con i segni manifesti di una poliomielite diffusa.

L'esame macroscopico venne confermato dal reperto istologico.

L'altra scimmia inoculata non presentò alcun segno di paralisi, e la temperatura ritornò alla norma.

#### CONSIDERAZIONI.

L'osservazione al microscopio elettronico di materiale contenente sicuramente virus poliomielitico, ha permesso la visione di corpuscoli elementari, sferici o allungati, i quali per le loro dimensioni corrispondono ai dati ottenuti con l'ultrafiltrazione, l'ultracentrifugazione e le irradiazioni  $\alpha$  ed x.

Per quanto l'immagine che si ottiene al microscopio elettronico non possiamo affermare ancora che corrisponda ad una realtà biologica, tuttavia

essa deve essere tenuta presente perchè ci fornisce un'approssimazione alla realtà.

I dati riferiti nella letteratura per le dimensioni dei corpuscoli ritenuti espressione del virus poliomieltico variano da 25 a 150  $\mu$  con un valore medio di 50  $\mu$ . (1, 2, 3, 4). I risultati dei nostri reperti ci danno una gamma più vasta di valori tra i 25  $\mu$  ed i 250  $\mu$ .

La figura N. 4 vuole essere soltanto il documento di un reperto di forma filamentosa, la cui natura ha bisogno di essere chiarita da ulteriori reperti.

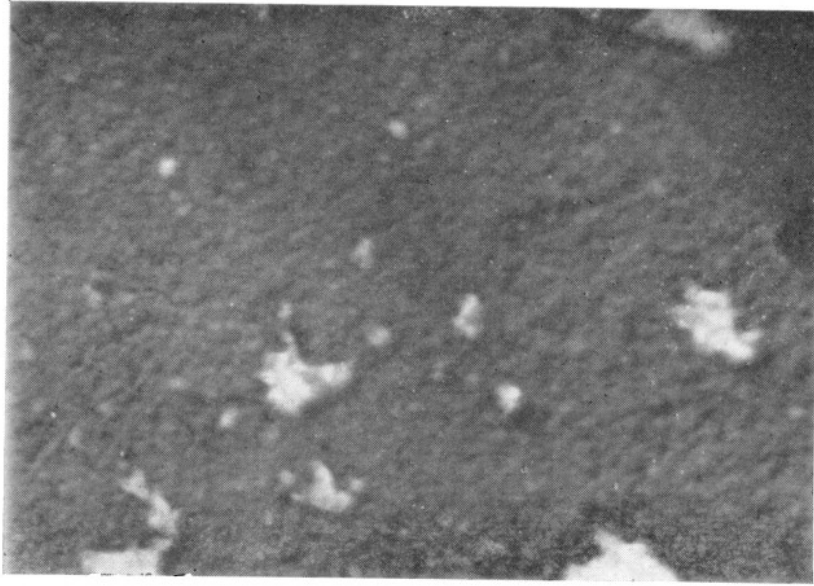
Le figure N. 1, 2, 3 e 4 sono state riportate per presentare un metodo di indagine che non trova riscontro nella letteratura: l'esame diretto al microscopio elettronico del sangue periferico di soggetti affetti da virosi, diluito sul terreno di cultura ed osservato dopo brevissima incubazione.

Ringrazio l'Istituto Superiore di Sanità dell'ospitalità accordatami per la esecuzione delle ricerche esposte nella presente nota.

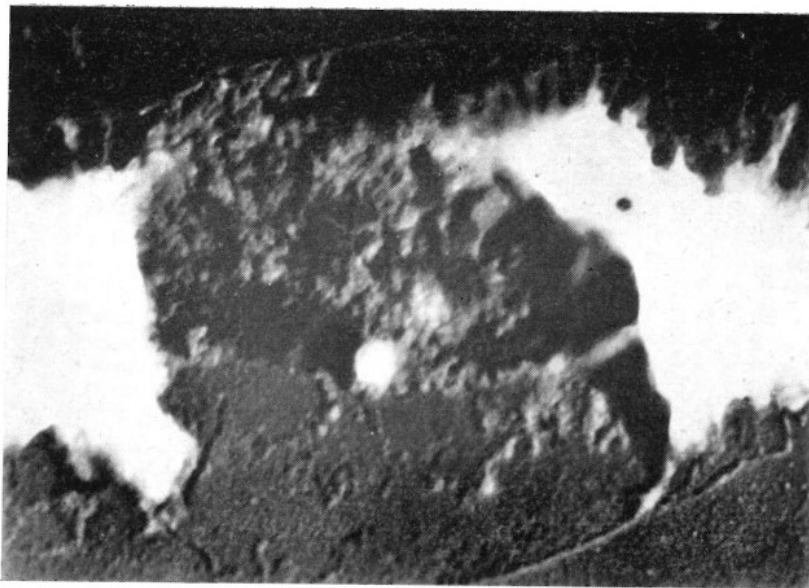
Roma - Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Clinica pediatrica e delle malattie infettive dell'Università.

#### BIBLIOGRAFIA

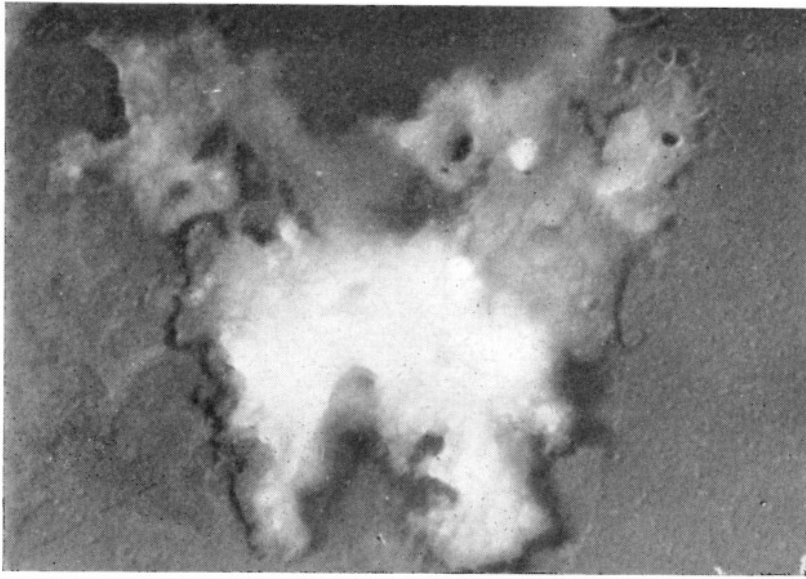
- (1) GARD: Acta Med. Scand., 148, 173, 1943.
  - (2) BOURDILLON: Arch. Biochem., 3, 285, 1943.
  - (3) LORING H. S., MARTON L. e SCHWERDT C. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 62, 291, 1946.
  - (4) REAGAN R. L., SCHENCK D. M., e BRUECKNER A. L.: J. Inf. Dis., 86, 295, 1959.
  - (5) BOCCIARELLI D. e TRABACCHI G. C.: Rend. Ist. San., 11, 791, 1948.
  - (6) BOCCIARELLI D. e TRABACCHI G. C.: Rend. Ist. San., 9, 762, 1946.
-



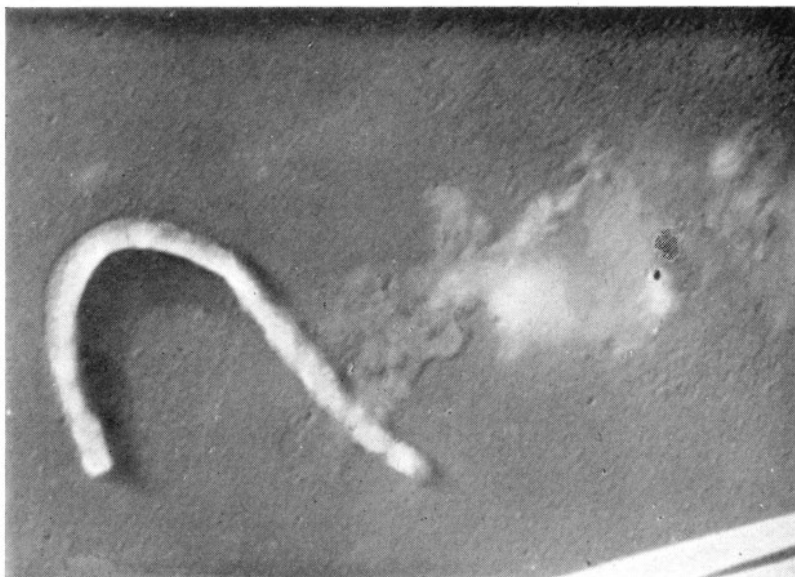
*Fig. 1.* - Superficie di un globulo rosso del sangue circolante, ombrata con cromo; si notano vari piccoli elementi in rilievo singoli ed ammassati.



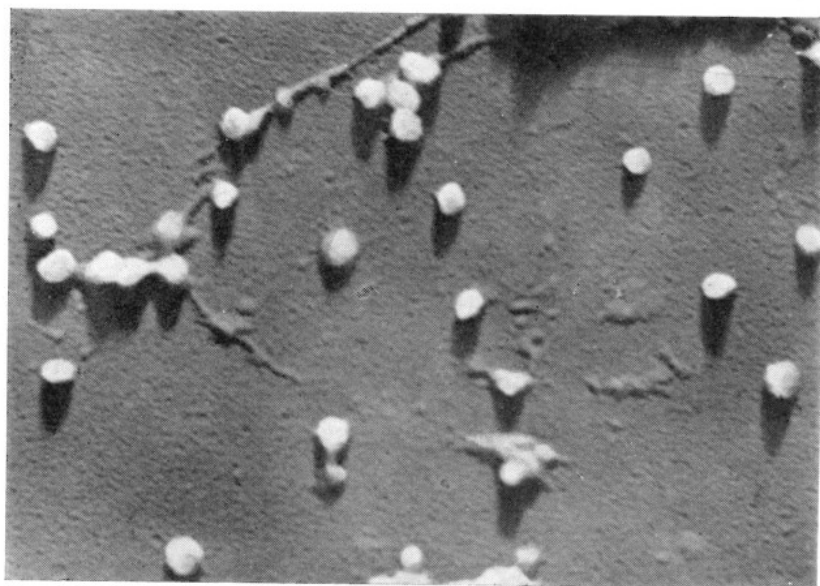
*Fig. 2.* - Superficie di un globulo bianco: al centro il protoplasma trasparente, ai lati i due nuclei opachi; al centro del protoplasma un elemento sferico, singolo rilevato.



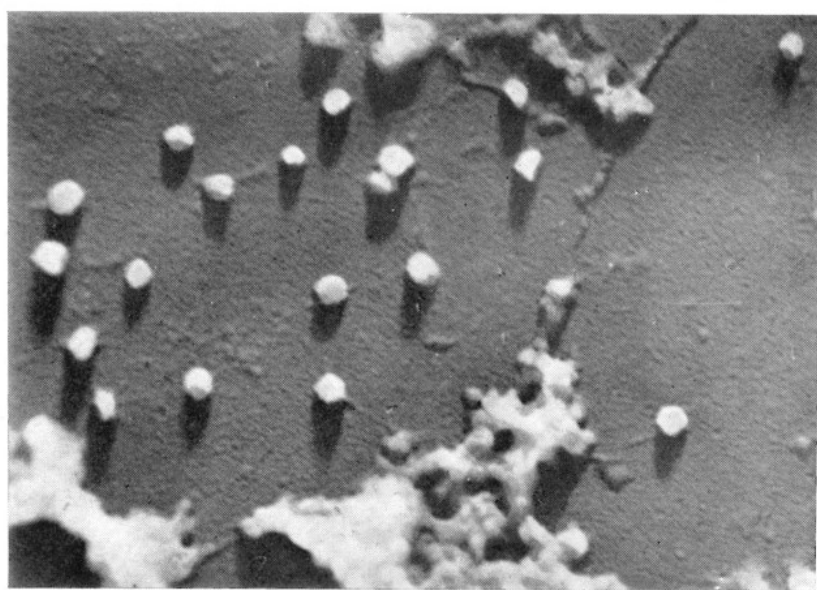
*Fig. 3.* - Superficie di un globulo bianco sul quale si notano diversi elementi sferici, rilevati, di varia grandezza.



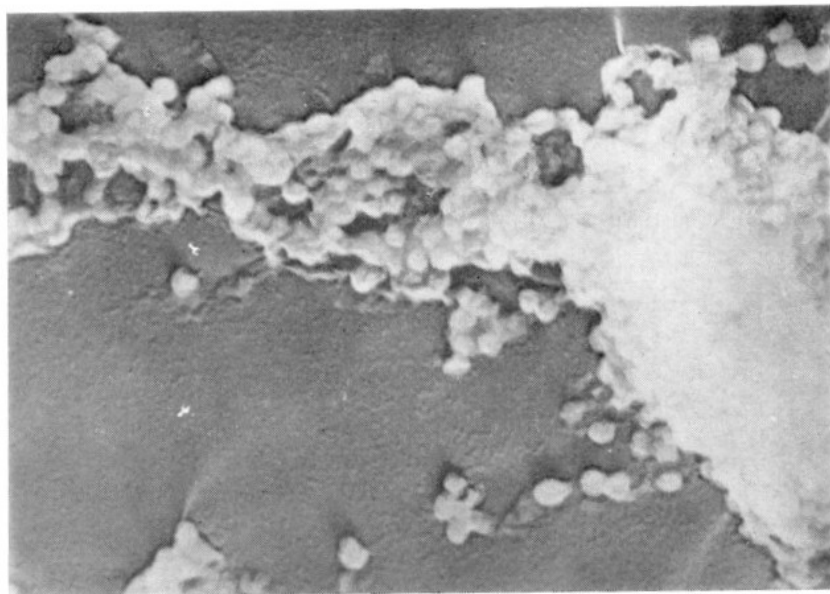
*Fig. 4.* - Forma filamentosa con aspetto corpuscolato dello stroma.



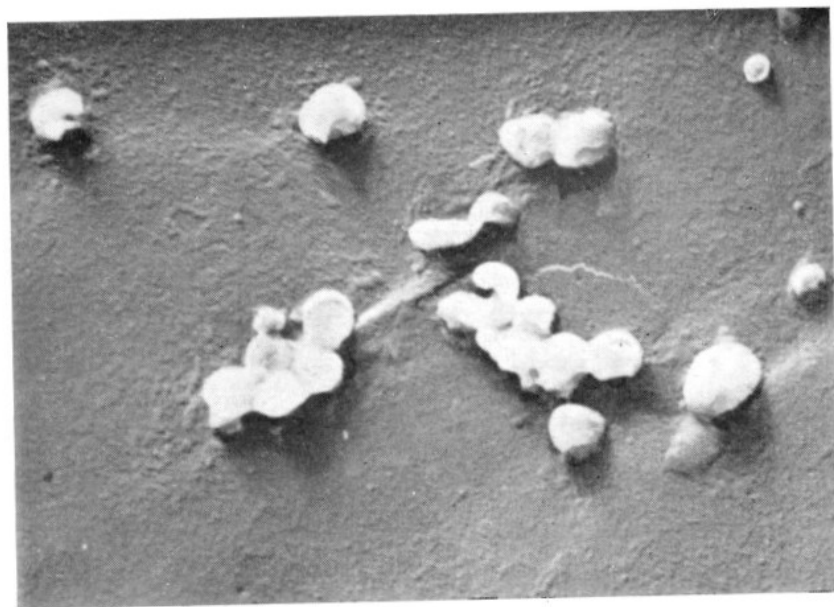
*Fig. 5.* - Elementi singoli dello stipite A.



*Fig. 6.* - Elementi singoli dello stipite A.



*Fig. 7.* - Ammassi di elementi dello stipite A.



*Fig. 8.* - Elementi singoli ed ammassati dello stipite B.

È da notare come la loro forma differisca da quella dello stipite A. Al centro si osservano due forme allungate.

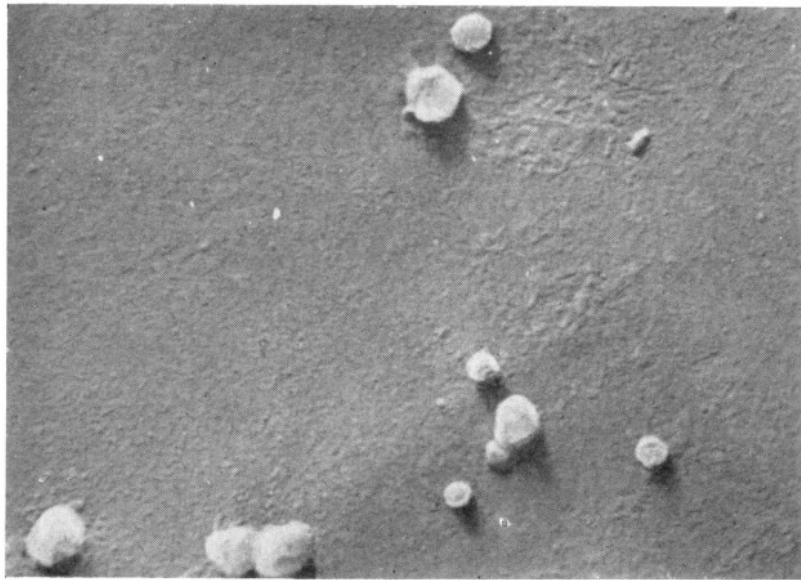


Fig. 9. - Elementi singoli di varia grandezza e forma stipite B.

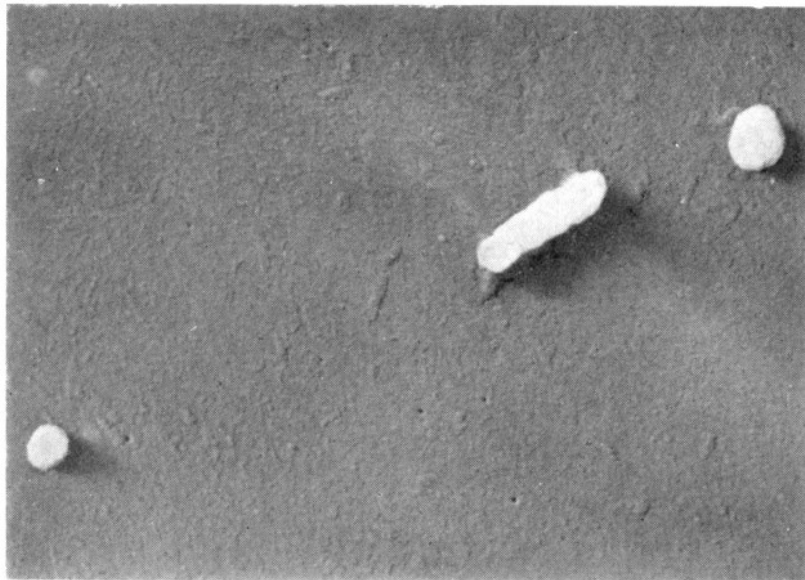


Fig. 10. - Una forma allungata tra due elementi sferoidali di grandezza diversa.