

69. I. ARCHETTI e F. L. HORSFALL Jr. — **Variazioni antigeniche persistenti di virus influenzale tipo A dopo incompleta neutralizzazione in ovo con siero immune eterologo. (\*)**

**Riassunto.** — Si possono ottenere varianti antigeniche di ceppi di virus influenzale tipo A mediante passaggi seriali *in ovo* in presenza di siero immune contro ceppi diversi, ma correlati.

Un vecchio ceppo di laboratorio (PR8) che ha subito centinaia di passaggi su animali è stato modificato, usando questa tecnica, nello stesso modo di ceppi isolati recentemente. Apparentemente tali varianti possono essere ottenute a volontà e dimostrano costituzioni antigeniche che sono riproducibili e appaiono prevedibili nei termini del siero immune usato per la loro selezione. I ceppi varianti mantengono la loro nuova costituzione antigenica dopo passaggi seriali *in ovo* in assenza del siero immune. Una limitata serie di passaggi *in ovo* dei ceppi in assenza di siero immune non portò alla formazione di varianti antigeniche. Similmente passaggi seriali *in ovo* di ceppi in presenza di siero immune contro ceppi notevolmente diversi, che non dimostrarono una neutralizzazione crociata significativa, non portarono alla formazione di varianti antigeniche.

**Résumé.** — On peut obtenir des variantes antigéniques de souches de virus grippal du type A par des séries de passages *in ovo* en présence d'immunsérum contre des souches différentes, mais ayant des caractères en commun.

Une vieille souche de laboratoire (PR8), qui avait subi des centaines de passages sur des animaux, a été modifiée utilisant cette technique, à l'égal de souches isolées récemment. En apparence ces variations peuvent être obtenues à volonté, et montrent des constitutions antigéniques qui sont reproductibles et paraissent prévisibles dans les termes de l'immunsérum employé pour leur selection. Les souches variantes gardent leur nouvelle constitution antigénique après des passages en série *in ovo* dans l'absence de l'immunsérum.

Une série limitée de passages *in ovo* de souches dans l'absence de l'immunsérum n'amena pas la formation de variantes antigéniques. Pareillement, des séries de passages *in ovo* de souches en présence de l'immunsérum contre des souches notablement différentes, n'ayant pas montré

---

(\*) La traduzione e la pubblicazione del lavoro, già apparso nel Journal of Experimental Medicine, 1950, vol. 92, pp. 441-462, hanno il permesso degli editori.

une neutralisation croisée significative, n'amenèrent point la formation de variantes antigéniques.

**Summary.** — Antigenic variants of influenza A virus strains emerge on serial passage *in ovo* in the presence of immune serum against different but related strains.

An old laboratory strain (PR8) which had been through hundreds of animal passages was as readily modified by this procedure as recently recovered strains. Such variants apparently can be obtained at will and show antigenic patterns which are reproducible and appear to be predictable in terms of the immune serum used for their selection. Variant strains retain their new antigenic patterns on serial passage *in ovo* in the absence of immune serum. Limited serial passage *in ovo* of strains in the absence of immune serum did not result in the emergence of antigenic variants. Similarly, serial passages of strains *in ovo* in the presence of immune serum against widely different strains, which failed to show significant cross-neutralization, did not lead to the appearance of antigenic variants.

**Zusammenfassung.** — Es können antigenische Varianten von Stämmen von Influenza-Virus « A » durch Serienpassagen *in ovo* in Anwesenheit von immunen Serumarten gegen verschiedene doch verwandte Stämme erhalten werden.

Ein alter Laboratoriumsstamm (PR8), der bereits mehrere hunderte Passagen auf Versuchstieren erlitten hatte, wurde mittels dieser Technik in der gleichen Weise wie frisch isolierte Stämme verändert. Es scheint dass solche Varianten nach Wunsch erhalten werden können und eine reproduzierbare antigenische Konstitution aufweisen, die je nach dem für die Selektion benützten immunen Serum voraussehbar ist.

Die Serum-Varianten ändern nicht ihre neue antigenische Konstitution nach Passagen in Serien « *in ovo* », in Abwesenheit des immunen Serums. Eine kürzere Serie von Passagen « *in ovo* » der Stämme in Abwesenheit des immunen Serums führte nicht zu antigenischen Varianten. In ähnlicher Weise führten Serienpassagen « *in ovo* » von Stämmen, in Gegenwart von immunem Serum gegen sehr verschiedene Stämme, die keine wesentliche Kreuzneutralisation aufwiesen, nicht zur Bildung von antigenischen Varianten.

---

La presenza di differenze antigeniche fra ceppi di virus influenzali venne dimostrata poco dopo la scoperta del virus (1). Molti studi sono stati compiuti nella ricerca dell'estensione e del significato di tali dif.

ferenze (2-7). L'insieme dei risultati indica che i ceppi isolati durante una singola epidemia non differiscono notevolmente (5-8,10), ma che ceppi isolati da epidemie di anni diversi possono dimostrare maggiori differenze antigeniche (11-13). Tanto l'estensione delle differenze nella composizione antigenica, come il loro rapporto riguardo all'immunizzazione contro l'influenza, sono divenuti progressivamente più evidenti da quando nel 1947 vennero isolati per la prima volta i così detti ceppi d'influenza tipo A primo (14) e i vaccini preparati con ceppi isolati precedentemente non riuscirono a produrre l'immunità nell'uomo (15).

Non solamente diversi ceppi di virus influenzale dimostrano differenze antigeniche non appena essi possono essere studiati dopo averli isolati dai pazienti, ma anche un singolo ceppo può andare incontro a variazioni antigeniche durante il passaggio negli animali ospiti. I primi lavori (16-18) indicano che una variazione antigenica può avvenire quando i ceppi vengono adattati ad un nuovo ospite. Studi successivi (19-21) portarono un notevole contributo a suffragio di questa conclusione. Ora vi sono buone ragioni per sospettare che un passaggio prolungato del virus influenzale in ogni nuova specie può condurre allo sviluppo di una variazione antigenica. Il passaggio di due ceppi adatti all'uovo e inizialmente simili, ha portato a cambiamenti divergenti delle loro caratteristiche antigeniche (19).

Per quanto l'evidenza riferentesi alla possibilità di una variazione antigenica dei virus influenzali sia notevole, pure tale evidenza manca per quanto riguarda il meccanismo del come tali varianti originino e divengano dominanti. Secondo i concetti correnti di mutazione delle specie microbiche, si può assumere che varianti del virus occorrenti naturalmente siano selezionate in base al caso nel passaggio in ospiti non naturali. Questa ipotesi è stata emessa per spiegare le variazioni osservate nel passaggio del virus influenzale nei polmoni di topo (19). Per quanto una simile ipotesi possa essere avanzata riguardo ai diversi ceppi isolati dall'uomo, se ne può considerare un'altra. La moltiplicazione del virus influenzale nei normali animali di laboratorio avviene in assenza di ogni immunità indotta contro l'agente; non vi sono in circolo anticorpi. Nell'uomo invece, particolarmente negli adulti, questo non è quanto di solito avviene e si ha la presenza di una certa immunità indotta come risultato di precedenti infezioni; anticorpi circolanti sono dimostrabili in un'alta percentuale di casi (22). In queste circostanze, se varianti antigeniche emergono durante la moltiplicazione, sorge la possibilità che quelle meno neutralizzabili dagli anticorpi presenti, siano le più adatte ad infettare altre cellule suscettibili. Così in persone con differente passato patologico o con differenti esperienze di immunizzazione e che si

infettino con un singolo ceppo, può darsi che originino popolazioni virali con caratteristiche antigeniche diverse. Questa possibilità è stata considerata precedentemente (10).

Questa ipotesi venne sottoposta alla prova sperimentale nella seguente maniera: ceppi differenti di virus influenzale vennero passati in serie nell'embrione di pollo in presenza di siero immune contro altri ceppi. La quantità di siero venne usata in modo che il virus fosse parzialmente ma non completamente neutralizzato durante ogni passaggio. I risultati ottenuti in questo studio indicano che in queste condizioni emergono regolarmente varianti antigeniche. I dati indicano anche che la variazione antigenica non avviene in una serie limitata di passaggi in una singola specie ospite in assenza del siero immune. Per di più si sono ottenuti risultati i quali suggeriscono che la caratteristica antigenica della variante differisce da quella del ceppo stipite in modo prevedibile, nei termini del siero immune usato e che il virus variante mantiene le sue nuove caratteristiche antigeniche dopo altri passaggi seriali in assenza del siero immune.

#### MATERIALI E METODI

*Virus.* Vennero usati 4 ceppi di Influenza tipo A: uno, PR8, ha subito molti passaggi attraverso polmone di topo ed embrione di pollo; gli altri SH, 965 e FMI, non hanno subito passaggi nei polmoni di topo e relativamente pochi su embrioni di pollo: rispettivamente 5, 6 e 10. Il ceppo 965 (20) venne dato dal dott. R. M. TAYLOR, International Health Division della Fondazione Rockefeller e venne isolato da un paziente malato nel novembre 1943. Il ceppo SH venne isolato in questo laboratorio da un paziente malato nel marzo 1948. Il ceppo PR8 (20) e il ceppo FMI (21) sono ceppi ben noti che sono stati usati da numerosi ricercatori. Come sorgente del virus venne usato il liquido allantoico infetto; fra un esperimento e l'altro i liquidi vennero conservati a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Le diluizioni del virus vennero preparate in brodo contenente il 10% di siero normale e inattivato di cavallo. Nella parte sperimentale del lavoro le serie di un particolare ceppo (ad es. FMI) sono contraddistinte come segue: ceppo originale = FMI<sub>0</sub>, ceppo di controllo = FMI c; ceppo passato in presenza del siero eterologo = FMI<sub>s</sub>; (la lettera minuscola corrisponde al ceppo eterologo, cioè in questo caso, SH).

*Titolazione del virus* — Le titolazioni dell'infettività del virus vennero eseguite secondo la tecnica intra allantoica descritta da HIRST (23); le titolazioni dell'emoagglutinazione vennero eseguite secondo la tecnica di HIRST (24), usando una concentrazione finale di globuli rossi di pollo del 0,5%.

*Siero immune* — Il siero anti virus venne preparato nei conigli come precedentemente descritto (25). Ogni coniglio veniva inoculato endovena con 10 cc. di liquido allantoico infetto e dopo una settimana riinoculato per via intraperitoneale con altri 10 cc.; il siero veniva ricavato due o tre settimane dopo la seconda iniezione e venne conservato a  $4^{\circ}\text{C}$ ., senza uso di preservativi. Venne preparato il siero immune contro ciascuno dei ceppi usati prima che cominciassero gli esperimenti. Nuovi sieri immuni vennero preparati dopo che ciascuno dei virus venne sottoposto a passaggi seriali di controllo in embrione di pollo, come pure dopo passaggi seriali in presenza del siero immune eterologo. In ciascuno dei casi vennero immunizzati due conigli. Per le titolazioni di inibizione dell'emoagglutinazione e per le titolazioni di neutralizzazione *in ovo* il siero venne inattivato a  $56^{\circ}\text{C}$  per 30'. Nella sezione sperimentale i diversi sieri immuni preparati con un particolare ceppo (ad es. FMI) sono identificati nel modo seguente: antisiero preparato con il ceppo originale FMI; antisiero preparato con

il ceppo controllo = FM1e; antisiero preparato dopo il passaggio con il siero eterologo = FM1s; (la lettera minuscola corrisponde al ceppo eterologo, in questo caso cioè al ceppo SH).

*Titolazioni degli anticorpi neutralizzanti* — Le titolazioni di neutralizzazioni *in ovo* furono fatte usando diluizioni seriali a ragione due di siero inattivato e una costante quantità di virus, secondo la tecnica precedentemente descritta (25). Si usò una diluizione 10<sup>-4</sup> di liquido allantoico infetto, corrispondente a 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> dosi infettanti di virus. E' stato dimostrato che l'errore sperimentale delle titolazioni degli anticorpi neutralizzanti usando questo metodo non è maggiore di quello che si ha nelle titolazioni degli anticorpi che inibiscono la emoagglutinazione (25). Per ogni titolazione si usarono miscele di sieri di due conigli immunizzati, a meno che non venga riferito diversamente. Le titolazioni di neutralizzazione crociata con due o più ceppi e i corrispondenti antisieri vennero, per quanto possibile, condotti simultaneamente.

*Titolazioni degli anticorpi inibenti l'emoagglutinazione* — Queste vennero fatte in un modo simile a quello descritto da HIRST (24); i dettagli della tecnica sono dati in un precedente lavoro (25). Vennero usate una concentrazione finale di globuli rossi di pollo del 0,5% e 8 unità emoagglutinanti. Per ogni titolazione vennero usate miscele di siero proveniente da due conigli immunizzati, a meno che non si riferisca diversamente. Le titolazioni di inibizione crociata della emoagglutinazione con due o più ceppi e i corrispondenti antisieri vennero eseguite sempre contemporaneamente.

*Rapporto del titolo degli anticorpi* — Per facilitare l'interpretazione dei risultati si è seguita la pratica usata da BURNET e LUSH (26) e modificata da HIRST (5), di esprimere i risultati di una titolazione ottenuta con un particolare siero, nei termini del rapporto del titolo eterologo diviso per il titolo omologo; non si è usato il così detto « avidity factor » impiegato da HIRST (5), poichè si voleva istituire un paragone diretto fra i risultati ottenuti nelle prove di neutralizzazione e di inibizione della emoagglutinazione e non sembrava giustificato l'uso di un fattore empirico di correzione nelle prove di neutralizzazione. Il metodo usato nell'analisi dei risultati e che è simile a quello impiegato da SMITH e ANDREWES (4), rende inutile l'uso di tale fattore. La media geometrica del rapporto ( $r_1$ ), trovato dividendo il titolo eterologo ottenuto con il virus 2 per il titolo omologo ottenuto con il virus 1, e il rapporto ( $r_2$ ), trovato dividendo il titolo eterologo ottenuto con il virus 1 per il titolo omologo ottenuto con il virus 2, è espressa dalla funzione:  $r = \sqrt{r_1 \times r_2}$ . Il valore  $r$  dà in un'unica cifra l'estensione della differenza antigenica fra due virus, quando entrambi gli antisieri siano usati in una reazione serologica crociata. Risulta evidente che considerato in questo modo, un rapporto maggiore di 1 (per es.  $r_1 = 2$ ) tende a cancellarsi con un rapporto minore di 1 (p. es.,  $r_2 = 1/2$ ) e quando entrambi abbiano uguale valore di estensione danno un valore di  $r = 1$ , segno di nessuna differenza antigenica. Poichè il rapporto  $r$  è la media geometrica dei due rapporti ottenuti usando virus eterologhi e i sieri omologhi, esso fornisce un valore che dà uguale peso alle differenze trovate nell'una e nell'altra direzione, cioè, siero 1 *versus* virus 2 e siero 2 *versus* virus 1, e rende non necessario di assumere che le differenze antigeniche siano reciproche. Nelle figure che accompagnano il testo, il rapporto  $r$  è usato nella forma  $1/r$  per semplificare i dati. E' evidente che in tutti i casi il rapporto del titolo omologo è 1 per definizione.

*Passaggi seriali del virus.* — Una diluizione 10<sup>-2</sup> di liquido allantoico infettato con un ceppo veniva mescolata con uguale quantità di ciascuna di una serie di diluizioni a ragione 2 di siero inattivato immune contro un altro ceppo. Le miscele vennero tenute a temperatura ambiente per 10 o 15' e poi 0,2 cc di ciascuna venivano inoculati nel sacco allantoico; per ogni miscela si usavano tre uova. Il liquido allantoico veniva raccolto dopo 48 ore di incubazione a 35° C. e controllato mediante la tecnica dell'emoagglutinazione. I liquidi positivi ottenuti dagli embrioni che erano stati inoculati con la più alta concentrazione di siero immune venivano usati per i passaggi. Ad ogni passaggio si usavano una diluizione 10<sup>-2</sup> di liquido allantoico, a meno che non venga altrimenti riferito nella parte sperimentale ed una serie di diluizioni a ragione 2 di siero immune. Dopo il numero di passaggi desiderato, da 6 a 12, in presenza di siero immune, veniva fatto come routine un altro passaggio in liquido allantoico senza siero. L'unica eccezione si è fatta con la serie SH-965. Il liquido infetto ottenuto dall'ultimo passaggio veniva conservato

TAVOLA I

Inibizione crociata dell'emoagglutinazione con 4 ceppi di virus influenzale tipo A.

S I E R O	V I R U S *			
	FMI	SH	PR8	965
	Titolo inibente del siero °			
FMI	640	512	160	40
SH	810	320	20	40
PR8	160	64	2560	240
965	320	160	320	1280
	Rapporto dei titoli §			
FMI	1	1/12	1/4	1/16
SH	2,5	1	1/16	1/8
PR8	1/16	1/32	1	1/10,7
965	1/4	1/8	1/4	1

\* 8 unità finali di ciascun virus.

° Ciascun titolo rappresenta la media geometrica di 3 o più valori limite.

§ Rapporto dei titoli = titolo eterologo diviso per il titolo omologo.

a — 70° C. come sorgente di virus per la titolazione degli anticorpi ed una parte veniva adoperata per immunizzare i conigli secondo la tecnica descritta più sopra. Ogni volta venne eseguita una serie parallela di controllo di passaggi in cui non venne adoperato siero immune. Il liquido allantoico infetto proveniente dall'ultimo passaggio delle serie di controllo veniva pure conservato a — 70° C., come sorgente per la titolazione degli anticorpi ed una parte venne pure usata per la immunizzazione dei conigli.

## PARTE SPERIMENTALE

*Relazioni antigeniche fra i ceppi originali.* — L'ipotesi che portò a questo lavoro era la seguente: le popolazioni di virus influenzali non sono omogenee, per la presenza di varianti antigeniche che originano casualmente in piccolo numero. Tali varianti possono essere selezionate con metodi atti a separarle dal numero ben più grande delle particelle virali tipiche. L'oggetto di queste ricerche è stato quello di trovare se le caratteristiche antigeniche di un ceppo vanno incontro ad alterazioni passando il ceppo nell'embrione di pollo in presenza di siero immune contro un'altro ceppo, diluito in modo da neutralizzare solo parzial-

mente il virus inoculato. Si scelsero 4 virus: 2 (PR8 e 965) sono tipici virus influenzali del gruppo A e furono isolati rispettivamente nel 1934 e 1943; gli altri 2 (FMI e SH) sono virus del così detto tipo A primo e furono isolati rispettivamente nel 1947 e 1948. Tutti, ad eccezione di PR8, furono isolati in embrione di pollo e hanno subito solamente 5-10 passaggi su questo ospite. Nessuno dei ceppi, tranne PR8, è stato mai passato attraverso polmone di topo.

Le relazioni antigeniche fra i 4 ceppi furono stabilite mediante i tests serologici. Le reazioni di inibizione crociata dell'emoagglutinazione vennero eseguite secondo il metodo già ricordato e sono raccolte nella Tav. I. Secondo i risultati *in vitro* non vi è alcun dato per una differenza fra FMI e SH, come appare evidente dai vari rapporti fra i titoli. Mediante il valore del rapporto  $r$  ( $r = \sqrt{r_1 \times r_2}$ ), come è stato più sopra riferito, l'estensione della relazione crociata fra due virus qualunque, risultante dal rapporto dei 2 titoli eterologhi, può essere espressa in un'unica cifra. Nel caso di FMI e SH,  $r = 1,4$ , il che indica che non vi è fra di essi una differenza antigenica significativa. Una netta differenza si trovò fra le caratteristiche antigeniche di PR8 e 965:

TAVOLA II

Neutralizzazione crociata con 4 ceppi di virus influenzale tipo A.

S I E R O	V I R U S *			
	FMI	SH	PR8	965
	Titolo neutralizzante del siero §			
FMI	320	95	40	5
SH	46	80	0	2
PR8	5	2	2560	260
965	4	3	40	160
	Rapporto dei titoli			
FMI	1	1/3,4	1/8	1/64
SH	1/1,7	1	1/80	1/40
PR8	1/512	1/1280	1	1/9,8
965	1/40	1/53	1/4	1

\* Diluizione del liquido allantoico: 10<sup>-4</sup>.

§ Vennero usate diluizioni seriali di siero a ragione 2.

$r = 1/6,5$ . Differenza ancora più netta venne riscontrata quando si confrontò SH con 965:  $r = 1/8$ . E' importante ricordare ancora che FM1, SH e 965 sono stati passati unicamente nell'embrione di pollo. In tal modo appare che vi sono nette differenze fra ceppi di virus di influenza tipo A che non siano stati passati attraverso un ospite appartenente ai mammiferi.

Le reazioni di neutralizzazione crociata con i 4 ceppi vennero eseguite *in ovo* secondo il metodo sopra descritto ed i risultati sono raccolti nella Tav. II. Mediante la neutralizzazione si misero in evidenza fra i ceppi differenze antigeniche molto più nette che non quelle rivelate dalla emoagglutinazione. Ciò risulta evidente quando si confrontino i diversi rapporti fra i titoli. La differenza fra FM1 e SH è indicata da  $r = 1/2,4$ ; fra PR8 e 965 da  $r = 1/6,3$ ; fra FM1 e 965 da  $r = 1/50,6$ , e fra SH e 965  $r = 1/46$ . Questi risultati aggiungono nuove prove all'opinione (<sup>10-13</sup>) che ceppi di influenza A, isolati in differenti annate e passati solamente poche volte nell'embrione di pollo, possono rivelare notevoli diversità nella loro caratteristica antigenica.

*Relazioni antigeniche fra i ceppi originali e i ceppi controllo* — Prima di cercare una interpretazione ai cambiamenti che si hanno passando i ceppi nell'embrione di pollo in presenza di siero immune eterologo, era essenziale dimostrare se si avessero alterazioni antigeniche evidenti nei ceppi controllo passati nell'embrione di pollo in assenza di siero. Sia FMI che SH furono passati per 12 volte di seguito nell'embrione di pollo; PR8 e 965 per 6 volte. In questi esperimenti di controllo non si usò naturalmente il siero immune. La tecnica seguita fu identica a quella descritta più sopra e i sieri immuni vennero preparati sia con i ceppi originali come pure con gli stessi dopo il numero stabilito di passaggi controllo.

Le relazioni antigeniche fra i ceppi originali ed i ceppi controllo vennero determinate mediante i tests serologici. Nella Tav. III sono raccolti i risultati delle reazioni di inibizione crociata della emoagglutinazione. In nessun caso i ceppi originali (contrassegnati o) e i ceppi controllo (contrassegnati c) mostrarono differenze antigeniche significative. Questo è ancora più evidente quando si comparino fra di loro i rapporti dei titoli ottenuti con ciascuno dei ceppi ed i loro corrispondenti sieri immuni. Anche quando furono impiegati antisieri contro ceppi eterologhi, ad es., SH *versus* FMI, o 965 *versus* PR8, non si dimostrò che differenze antigeniche fossero originate come risultato dei passaggi in serie nell'embrione di pollo in assenza del siero immune.

TAVOLA III

Inibizione crociata dell'emoagglutinazione con i ceppi originali ed i ceppi controllo.

S I E R O	V I R U S °							
	FMI		SH		PR8		965	
	o	c*	o	c*	o	c <sup>+</sup>	o	c <sup>+</sup>
Titolo inibente del siero								
FMI o	640	1280	512	320				
» c*		640		810				
SH o	810	910	320	250				
» c*		2560		640				
PR8 o					2560	1820	240	160
» c <sup>+</sup>						2560		160
965 o					320	640		1620
» c <sup>+</sup>						640	1280	2040
Rapporto dei titoli								
FMI o	1	2	1,1,2	1/2				
» c		1		1,3				
SH o	2,5	2,8	1	1/1,3				
» c		4		1				
PR8 o					1	1/1,4	1/10,7	1/16
» c						1		1/16
965 o					1/4	1/2	1	1,2
» c						1/3,2		1

o 8 unità finali di ciascun virus; o = originale; c = passaggio controllo.

\* Dopo 12 passaggi su embrione di pollo

+ Dopo 6 passaggi su embrione di pollo.

§ Ciascun titolo rappresenta la media geometrica di 2 o più valori limite.

Nella Tav. IV sono raccolti i risultati delle reazioni di neutralizzazione crociata ottenute con i ceppi originali (o) e i ceppi controllo (c) derivati da PR8 e 965. Come per le reazioni *in vitro*, così pure per queste si è trovata una stretta corrispondenza fra i rapporti dei titoli ottenuti con ciascuno dei ceppi originali e di quelli di controllo. Ciò offre un elemento di ulteriore evidenza a sostegno della conclusione che nessun cambiamento nelle caratteristiche antigeniche si ha dopo un numero limitato di passaggi nell'embrione di pollo. In base a questo sembra giustificato di considerare come dipendenti dal siero antivirale quelle alterazioni significative nelle caratteristiche antigeniche, che appaiono dopo passaggio in presenza del siero immune eterologo.

*Riduzione della capacità ad essere neutralizzati di ceppi passati in presenza del siero immune eterologo* — Vennero eseguite otto serie di passaggi seriali in cui le diluizioni di siero immune eterologo vennero mescolate con un ceppo prima di ogni passaggio. Ciascuno dei quattro ceppi venne usato in una o più di queste serie; le condizioni sperimentali

TAVOLA IV

Reazione di neutralizzazione crociata con i ceppi originali e i ceppi di controllo.

S I E R O	V I R U S *			
	PR8		965	
	o	c§	o	c§
	Titolo neutralizzante del siero			
PR8 o	2560	2560	260	320
» c§		320		20
965 o	40	20	160	160
» c§		80		640
	Rapporto dei titoli			
PR8 o	1	1	1/9,8	1/8
» c		1		1/8
965 o	1/4	1/8	1	1
» c		1/8		1

\* Diluizione 10<sup>-4</sup> di ciascun virus.

§ Dopo 6 passaggi su embrione di pollo.

TAVOLA V

Diminuzione della proprietà di essere neutralizzato del virus passandolo serialmente in presenza di siero immune eterologo.

VIRUS		SIERO*	Passaggi in presenza di siero N.	Diluizione del siero necessaria per neutralizzare il virus	
	Dil.				Cambiamento volte
FMI	10 <sup>-2</sup>	SH (a)	0	20	
			6	10	
			12	< 5	> 4
SH	10 <sup>-2</sup>	FMI (a)	0	40	
			6	40	
			12	10	4
FMI	10 <sup>-2</sup>	SH (b)	0	20	
			6	5	
			12	< 5	> 4
SH	10 <sup>-2</sup>	FMI (b)	0	80	
			6	40	
			12	40	2
PR8	10 <sup>-2</sup>	965	0	40	
			3	10	
			6	< 2	> 20
965	10 <sup>-2</sup>	PR8	0	80	
			3	5	
			6	< 2	> 40
SH	10 <sup>-3</sup>	965	0	< 2	
	10 <sup>-7</sup>		6	< 2	
	10 <sup>-7</sup>		12	< 2	0
965	10 <sup>-2</sup>	SH	0	< 2	
	10 <sup>-7</sup>		6	< 2	
	10 <sup>-6</sup>		12	< 2	0

\* a e b indicano sieri di differenti paia di conigli.

sono state descritte più sopra. Nella Tav. V è raccolto un sommario dei risultati. Nelle prime sei serie si usò una quantità costante di virus, precisamente  $10^{-2}$ , con diluizioni di ragione due di siero immune; nelle due ultime serie si usò appena una diluizione di virus  $10^{-7}$ , per ottenere almeno una certa neutralizzazione del ceppo eterologo. Quantità crescenti dello stesso siero immune furono necessarie per neutralizzare una quantità costante di ciascun virus nei passaggi fatti nelle prime sei serie. Nel caso delle due ultime serie con SH e 965, non si ottenne completa neutralizzazione nemmeno quando furono usate alte concentrazioni di siero, precisamente 1 : 2, e una piccolissima quantità di virus, cioè  $10^{-7}$ . I risultati dimostrano che nelle prime sei serie vi è stata nel virus una progressiva diminuzione della capacità ad essere neutralizzato da parte del siero immune eterologo e costituiscono nello stesso tempo un indice che le caratteristiche antigeniche dei ceppi stavano subendo delle alterazioni con il continuare dei passaggi. La dimostrazione diretta di questo postulato è riferita più sotto.

*Variazione antigenica ottenuta in SH e FMI mediante passaggio con siero immune eterologo* — Due esperimenti completi e separati vennero fatti usando i ceppi SH e FMI: in ciascuna delle prove vennero eseguiti dodici passaggi seriali. Nel primo esperimento si usò un paio di sieri immuni eterologhi; nel secondo un altro paio di sieri immuni simili ai primi. Le tecniche seguite e i controlli impiegati sono descritti più sopra.

I risultati delle reazioni di neutralizzazione crociata ottenuti con SH, FMI e le varianti derivate da ciascuno di essi passandoli in presenza del siero immune eterologo, sono raccolti nella Tav. VI. Dai rapporti dei titoli risulta evidente che  $SH_f$ , il ceppo derivato da SH passandolo in presenza di siero anti-FMI, differisce dal virus originale (SH). L'evidenza di una differenza antigenica si ottenne dopo entrambi gli esperimenti condotti indipendentemente l'uno dall'altro. Similmente, l'esame dei rapporti dei titoli rivela che  $FMI_g$ , la variante derivata da FMI passandolo con siero anti-SH, ha dimostrato differenze marcate nelle caratteristiche antigeniche rispetto al virus originale (FMI). Le differenze antigeniche fra i due ceppi originali e le varianti da essi derivate, come risultarono dalle reazioni di neutralizzazione *in ovo*, sono raffigurate graficamente nella Fig. 1.

I rapporti ( $r$ ) rappresentano la media geometrica dei 2 rapporti dei titoli eterologhi ( $r_1$  e  $r_2$ ), ottenuti con ciascuno dei due ceppi e i loro antisieri. Come più sopra descritto, il rapporto è calcolato per mezzo dell'equazione  $r = \sqrt{r_1 \times r_2}$  e dà in una singola cifra l'estensione della dissimiglianza nelle caratteristiche antigeniche di due ceppi. E' da notare che in ciascun caso il rapporto  $r$  dipende da un minimo di 4 titolazioni di anticorpi. Nelle condizioni seguite per queste prove, valori di  $1/r$  di 2 o più possono essere considerati come significativi. Quanto più grande è il valore di  $r$ ,

TAVOLA VI

Neutralizzazione crociata con SH, FMI e le varianti derivate da ciascuno di essi passandoli con siero immune eterologo.

PROVA	SIERO*	VIRUS*			
		SH <sub>c</sub>	SH <sub>f</sub>	FMI <sub>c</sub>	FMI <sub>s</sub>
		Titolo neutralizzante del siero			
I	SH <sub>o</sub>	160	20	40	0
	SH <sub>f</sub>	80	160	160	5
	FMI <sub>o</sub>	80	40	320	20
	FMI <sub>s</sub>	5	5	40	160
		Rapporto dei titoli			
	SH <sub>o</sub>	1	1/8	1/4	1/160
	SH <sub>f</sub>	1/2	1	1	1/32
	FMI <sub>o</sub>	1/4	1/8	1	1/16
	FMI <sub>s</sub>	1/32	1/32	1/4	1
		Titolo neutralizzante del siero			
II	SH <sub>o</sub>	160	20	40	0
	SH <sub>f</sub>	80	40	160	10
	FMI <sub>o</sub>	80	40	320	20
	FMI <sub>s</sub>	5	2	40	80
		Rapporto dei titoli			
	SH <sub>o</sub>	1	1/8	1/4	1/160
	SH <sub>f</sub>	2	1	4	1/4
	FMI <sub>o</sub>	1/4	1/8	1	1/16
	FMI <sub>s</sub>	1/16	1/40	1/2	1

\* Il contrassegno o = originale; c = dopo i passaggi di controllo; f = dopo i passaggi con siero FMI; s = dopo i passaggi con siero SH.

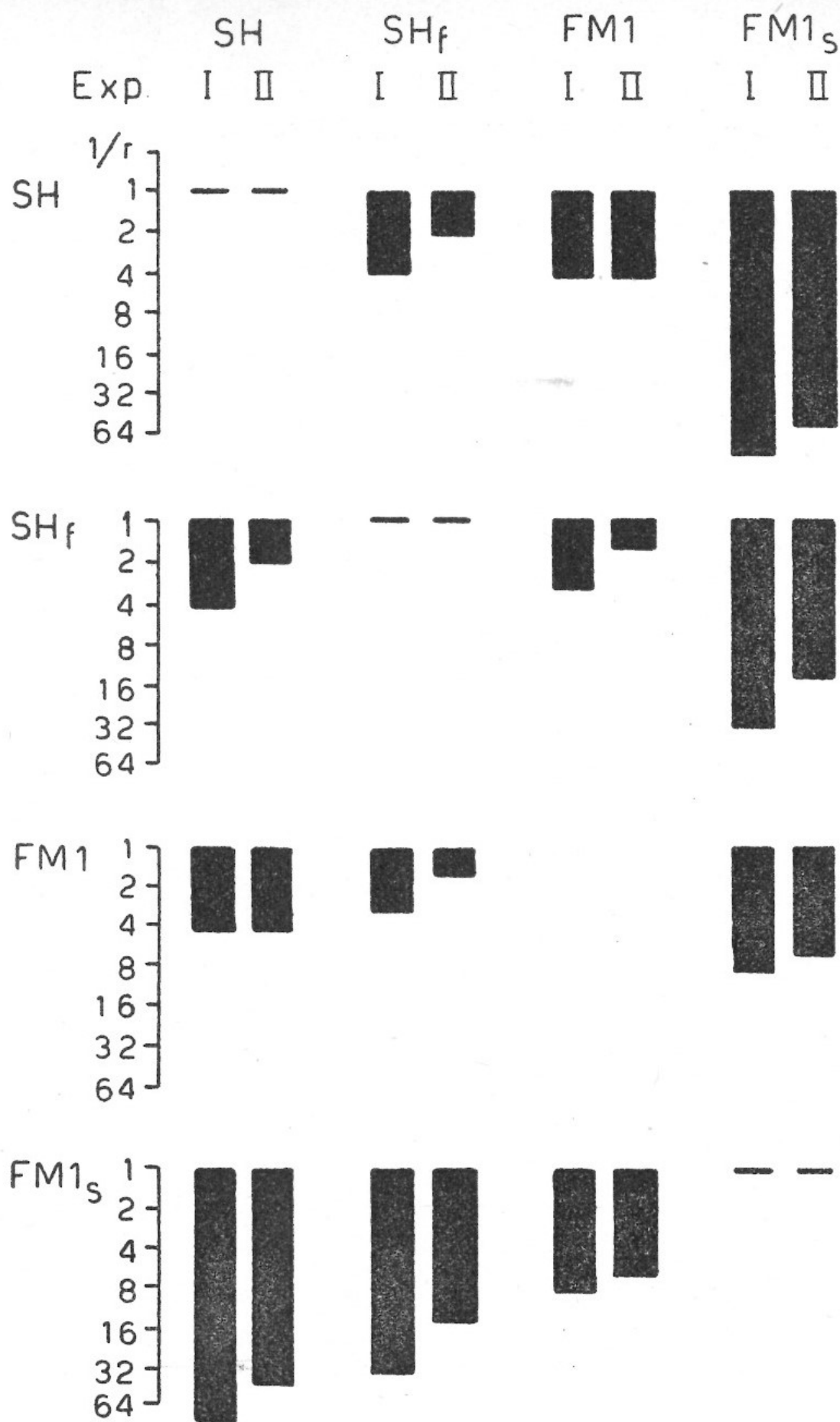


Fig. 1. — Estensione delle reazioni di neutralizzazione crociata *in ovo* con SH, FMI, e le varianti da essi derivate mediante passaggi seriali *in ovo* in presenza di siero immune eterologo. Il I e il II esperimento furono identici, ma condotti indipendentemente. Il rapporto  $r$ , qui rappresentato con il valore reciproco, è la media geometrica dei 2 rapporti ottenuti con i titoli eterologhi e rappresenta il grado di dissimiglianza antigenica fra 2 ceppi. Quanto più grande è il valore di  $1/r$ , tanto maggiore è la differenza nelle caratteristiche antigeniche dei 2 ceppi. Il valore dei rapporti omologhi è per definizione uguale a 1. I titoli dei sieri e i rapporti dei titoli sono raccolti nella Tav. VI.

tanto maggiore è la dissimiglianza antigenica. Si può dimostrare che, su basi percentuali, un valore di 2 per  $1/r$  equivale a una relazione crociata antigenica del 50%; 4 = 25%; 8 = 12,5%; 16 = 6,2%; 32 = 3,1%; 64 = 1,6%; 128 = 0,8%; ecc.

La variante derivata da SH ( $SH_f$ ) e quella derivata da FMI (FMI) risultarono differenti nella loro caratteristica antigenica rispetto ai virus originali che erano stati sottoposti ad un numero uguale e parallelo di passaggi controllo. I risultati riferentisi alle variazioni antigeniche indotte mediante questa tecnica furono nettamente simili sia nel primo che nel secondo esperimento, indicando così che le alterazioni sono riproducibili, naturalmente nelle condizioni sperimentali seguite.

Le reazioni di inibizione crociata dell'emoagglutinazione fra SH, FMI, e le varianti da essi derivate passandoli con siero immune eterologo, sono raccolte nella Tav. VII. E' ovvio dall'esame dei rapporti dei titoli che le differenze rivelate fra  $SH_f$  e  $SH_c$  dalle reazioni di neutralizzazione crociata *in ovo* non apparirono dopo entrambi gli esperimenti, usando le reazioni di inibizione crociata dell'emoagglutinazione. Le differenze antigeniche fra  $FMI_s$  e  $FMI_c$  furono però di una estensione molto simile a quelle ottenute con le reazioni *in vivo*. Le differenze nelle caratteristiche antigeniche fra i ceppi originali e le loro varianti, come risultarono dalle reazioni di inibizione dell'emoagglutinazione, sono rappresentate graficamente nella Fig. 2. Il rapporto usato è identico a quello impiegato nella Fig. 1. E' chiaro che le reazioni *in vitro* benchè rivelino differenze in un certo qual modo meno marcate delle reazioni *in vivo*, hanno dimostrato che la variante  $FMI_s$  derivata da FMI, era notevolmente diversa dal virus originale, che era stato sottoposto ad un uguale numero di passaggi controllo. E' importante notare che in queste prove si ebbe una nuova evidenza che i risultati ottenuti in due esperimenti separati furono strettamente simili, indicando così un alto grado di riproducibilità.

I dati raccolti nelle Figg. 1 e 2 dimostrano che la variante  $FMI_s$  differisce da SH in un grado molto più alto che l'originale FMI. Poichè la variante venne ottenuta mediante passaggi con siero anti-SH, l'alterazione nella caratteristica antigenica deve essere nei termini del postulato più sopra stabilito. Appare chiaro che un passaggio prolungato di entrambi i ceppi SH o FMI in presenza dell'antisiero contro l'altro ceppo, ha portato in ciascuno dei due esperimenti alla formazione di ceppi virali varianti con caratteristiche antigeniche diverse da quelle dei ceppi originali. Poichè vennero trovate differenze prettamente simili dopo i passaggi con l'una o l'altra delle due paia di sieri immuni usati, sembra che la caratteristica antigenica della variante sia riproducibile in un grado sorprendente.

*Variazione antigenica ottenuta in PR8 e 965 mediante passaggio con siero immune eterologo* — Due esperimenti successivi, ciascuno di sei pas-

TAVOLA VII

Inibizione crociata dell'emoagglutinazione con SH, FMI e le varianti derivate da ciascuno di essi passandoli con siero immune eterologo.

P R O V A	S I E R O *	V I R U S *			
		SH <sub>c</sub>	SH <sub>f</sub>	FMI <sub>c</sub>	FMI <sub>s</sub>
		Titolo inibente del siero			
I	SH <sub>o</sub>	320	160	640	40
	SH <sub>f</sub>	640	240	1280	320
	FMI <sub>o</sub>	320	160	1280	160
	FMI <sub>s</sub>	320	60	320	1280
		Rapporto dei titoli			
	SH <sub>o</sub>	1	1/2	2	1/8
	SH <sub>f</sub>	2,6	1	5,3	1/1,3
	FMI <sub>o</sub>	1/4	1/8	1	1/8
	FMI <sub>s</sub>	1/4	1,21,3	1/4	1
		Titolo inibente del siero			
II	SH <sub>o</sub>	640	320	2560	80
	SH <sub>f</sub>	640	320	1280	640
	FMI <sub>o</sub>	320	320	2560	320
	FMI <sub>s</sub>	320	80	320	1280
		Rapporto dei titoli			
	SH <sub>o</sub>	1	1/2	4	1/8
	SH <sub>f</sub>	2	1	4	2
	FMI <sub>o</sub>	1/8	1/8	1	1/8
	FMI <sub>s</sub>	1/4	1/16	1,4	1

\* I simboli sono identici a quelli usati nella Tav. VI.

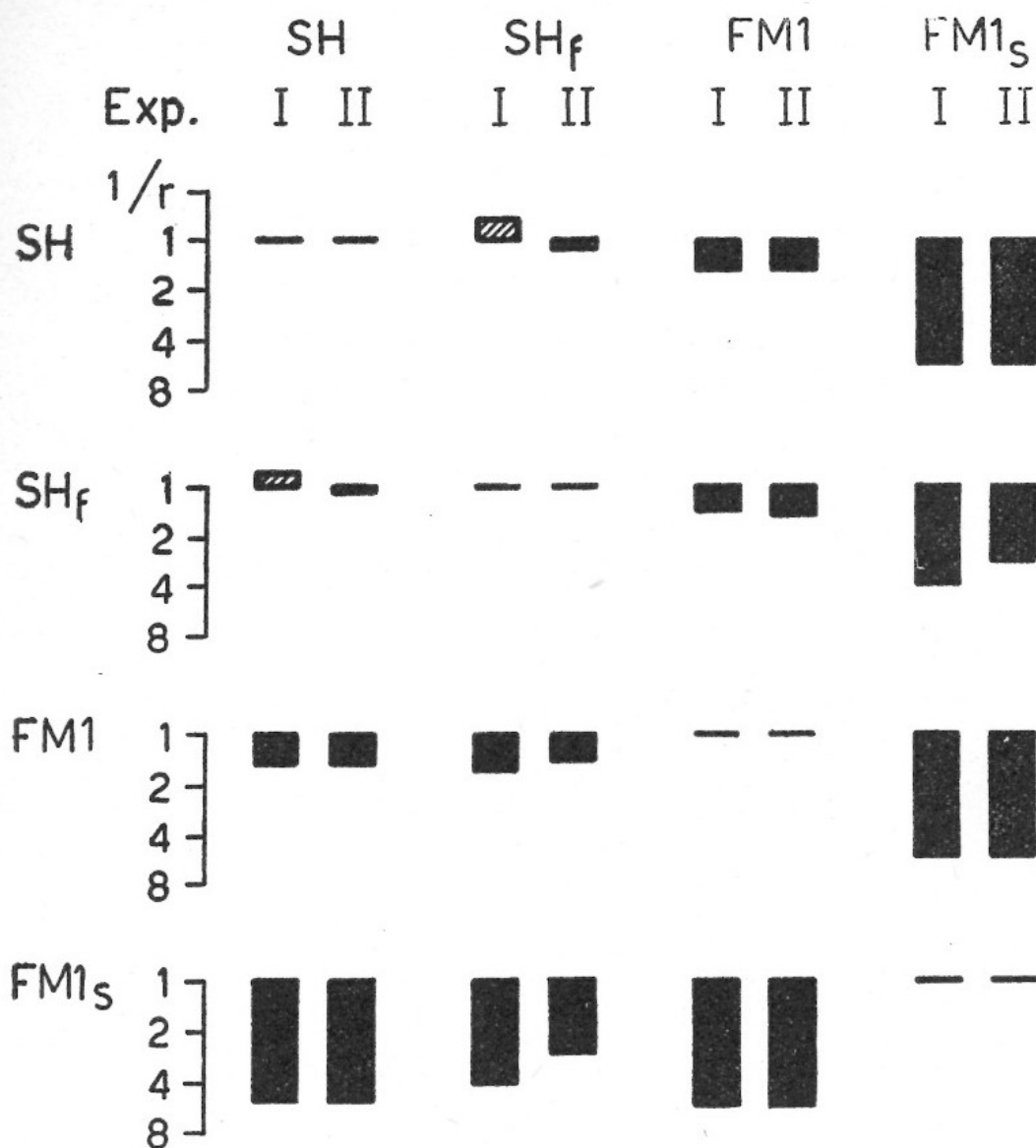


Fig. 2. — Estensione delle reazioni di inibizione crociata della emoagglutinazione con SH, FMI, e le varianti da essi derivate mediante passaggi seriali *in ovo* in presenza di siero immune eterologo. I titoli dei sieri e i rapporti dei titoli sono raccolti nella Tav. VII.

saggi seriali, furono condotti con PR8 e 965. Nel primo esperimento ciascun virus venne passato in presenza del siero immune contro l'altro. Dopo questo esperimento vennero fatti ulteriori passaggi senza siero, usando i ceppi ottenuti dal primo esperimento. Scopo di questo era di trovare se le differenze antigeniche emerse nel primo esperimento persistessero durante una seconda serie di passaggi, in assenza di quelle condizioni sperimentalmente usate per selezionare le varianti di diversa caratteristica antigenica. La tecnica fu identica a quella sopra descritta e includeva, come negli esperimenti con gli altri virus, serie parallele di passaggi controllo senza siero.

I risultati delle reazioni di neutralizzazione crociata ottenuti con PR8 e 965, come pure con le varianti da essi derivate nei due successivi esperimenti, sono raccolti nella Tav. VIII. Dall'esame dei rapporti dei titoli ap-

TAVOLA VIII

Reazioni di neutralizzazione crociata con PR8,965 e le varianti derivate da ciascuno di essi passandoli con siero immune eterologo.

PROVA	SIERO*	VIRUS*			
		PR8 <sub>c</sub>	PR8 <sub>9</sub>	965 <sub>c</sub>	965 <sub>p</sub>
		Titolo neutralizzante del siero			
I Con siero	PR8 <sub>o</sub>	2560	1280	320	160
	PR8 <sub>9</sub>	1280	320	2	0
	965 <sub>o</sub>	20	5	160	40
	965 <sub>p</sub>	160	10	160	320
		Rapporto dei titoli			
	PR8 <sub>o</sub>	1	1/2	1/8	1/16
	PR8 <sub>9</sub>	4	1	1/160	1/320
	965 <sub>o</sub>	1/8	1/32	1	1/4
	965 <sub>p</sub>	1/2	1/32	1/2	1
		Titolo neutralizzante del siero			
II Ulteriori passaggi senza siero	PR8 <sub>o</sub>	2560	1280	320	160
	PR8 <sub>9</sub>	1280	160	2	2
	965 <sub>o</sub>	20	5	160	40
	965 <sub>p</sub>	160	10	160	160
		Rapporto dei titoli			
	PR8 <sub>o</sub>	1	1/2	1/8	1/16
	PR8 <sub>9</sub>	8	1	1/80	1/80
	965 <sub>o</sub>	1/8	1/32	1	1/4
	965 <sub>p</sub>	1	1/16	1	1

\* Il contrassegno o = originale; c = dopo i passaggi di controllo; 9 dopo i passaggi con siero 965; p = dopo i passaggi con il siero PR8.

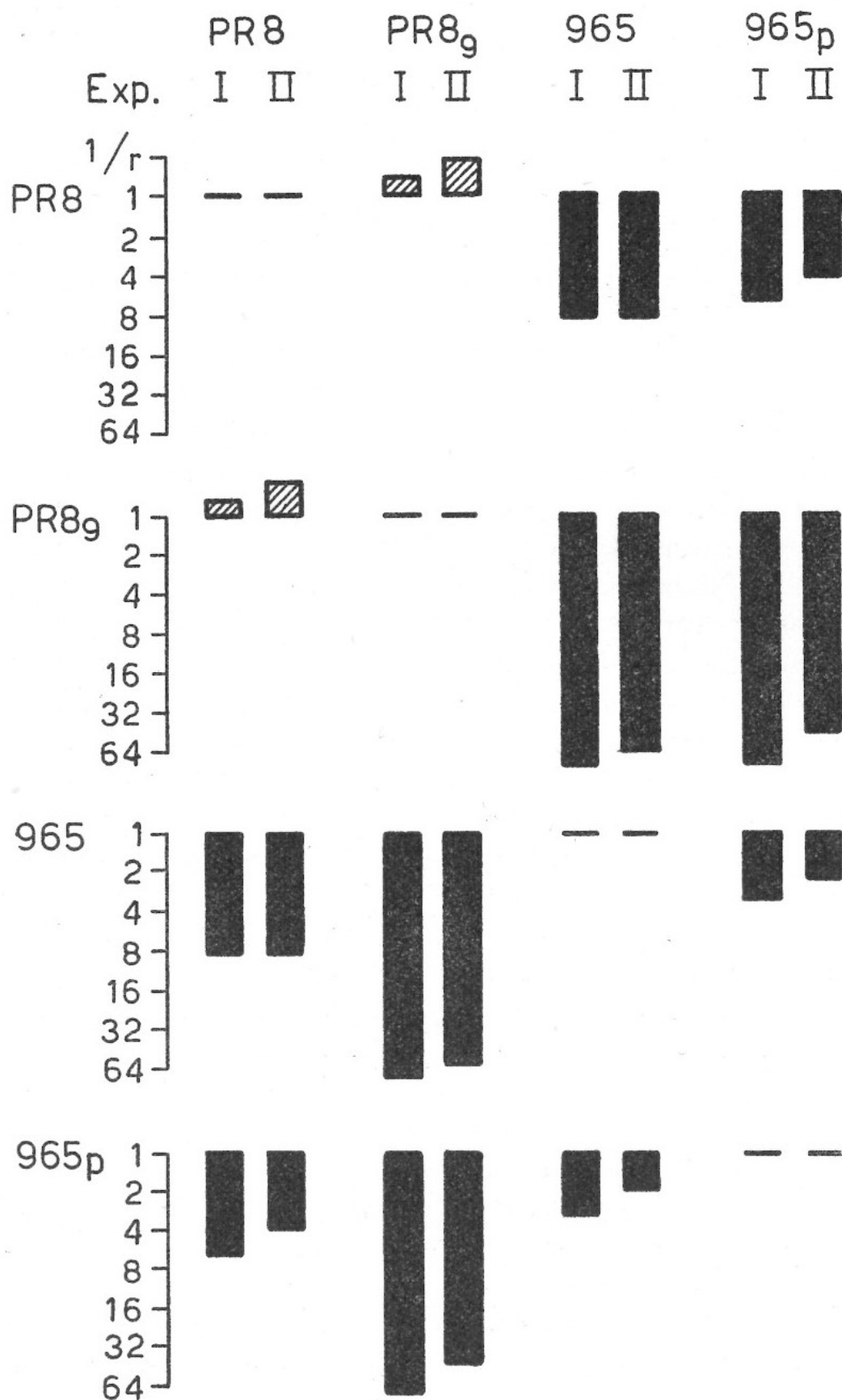


Fig. 3. — Estensione delle reazioni di neutralizzazione crociata *in ovo* con PR8, 965, e le varianti da essi derivate mediante passaggi *in ovo* in presenza di siero immune eterologo. Esperimento I, con siero immune; esperimento II, usando i ceppi dopo ulteriori passaggi senza siero. I titoli dei sieri ed i rapporti dei titoli sono raccolti nella Tav. VIII.

pare evidente che vi era una certa differenza antigenica fra PR8<sub>c</sub> e PR8<sub>9</sub>, la variante ottenuta da PR8 passandolo in presenza di siero anti-965; tale differenza risultò più chiara dalle reazioni con siero immune eterologo, precisamente 965<sub>o</sub> e 965<sub>p</sub>. Chiare differenze nella caratteristica antigenica furono dimostrate fra 965<sub>c</sub> e 965<sub>p</sub>, la variante ottenuta da 965 passandolo in presenza di siero anti-PR8. Le differenze antigeniche apparvero dopo una serie di passaggi fatti nel primo esperimento con siero immune eterologo; di maggiore importanza è il fatto che esse persistettero dopo una serie di passaggi effettuati nel secondo esperimento, quando non venne usato alcun siero immune. I risultati ottenuti, dopo la loro conversione nel rapporto *r* a mezzo dell'equazione data più sopra, sono raccolti nella Fig. 3.

I risultati delle reazioni di inibizione della emoagglutinazione con PR8, 965 e le varianti da essi derivate, sono raccolti nella Tav. IX. Con questo paio di virus, in contrasto con SH e FMI, la estensione delle differenze antigeniche appare più evidente dalle reazioni di inibizione dell'emoagglutinazione *in vitro*, che dalle reazioni di neutralizzazione *in vivo*. L'aver trovato con PR8 e 965, come anche con SH e FMI che le reazioni serologiche crociate *in vitro* e *in vivo* non sono esattamente comparabili sia qualitativamente che quantitativamente, è in accordo con l'evidenza già ottenuta (25) che gli anticorpi contro i virus influenzali inibenti l'emoagglutinazione e quelli neutralizzanti non sono identici. Sembra evidente che il ceppo variante PR8<sub>9</sub> era diverso dal ceppo originale PR8, e che la variante 965<sub>p</sub> era differente dall'originale 965. Anche qui, come per le reazioni di neutralizzazione, le differenze sono chiaramente rivelate usando i sieri eterologhi, precisamente PR8<sub>c</sub> e PR8<sub>9</sub> *versus* siero 965<sub>o</sub>. Questi risultati sono raccolti graficamente nella Fig. 4. E' evidente che i ceppi varianti ottenuti nel primo esperimento erano antigenicamente diversi dai ceppi originali e reagivano meno bene con i sieri immuni eterologhi usati per selezionarli di quanto lo facessero i virus originali. Secondo l'ipotesi, a base di questo lavoro, era da attendersi un tale cambiamento nella caratteristica antigenica.

I cambiamenti indotti in PR8 stanno a indicare che varianti antigeniche possono essere ottenute anche da ceppi di laboratorio molto vecchi (20), che abbiano subito centinaia di passaggi in varie specie ospiti. La persistenza delle mutate caratteristiche antigeniche delle varianti nei nuovi passaggi fatti in assenza del siero immune è provata chiaramente dalla stretta somiglianza dei risultati ottenuti nel primo e nel successivo esperimento. Questi risultati suggeriscono l'ipotesi che allorquando una nuova costituzione antigenica sia emersa, essa possa rimanere come un carattere trasmissibile pure in assenza delle condizioni che ne hanno determinato il selezionamento.

TAVOLA IX

Inibizione crociata dell'emoagglutinazione con PR8, 965 e le varianti derivate da ciascuno di essi passandoli con siero immune eterologo.

P R O V A	S I E R O *	V I R U S *			
		PR8 <sub>c</sub>	PR8 <sub>g</sub>	965 <sub>c</sub>	965 <sub>p</sub>
		Titolo inibente del siero			
I Con siero	PR8 <sub>c</sub>	2560	320	320	40
	PR8 <sub>g</sub>	2560	1280	80	40
	965 <sub>o</sub>	320	80	2560	160
	965 <sub>p</sub>	320	160	640	2590
		Rapporto dei titoli			
	PR8 <sub>c</sub>	1	1/8	1/8	1/64
	PR8 <sub>g</sub>	2	1	1/16	1/32
	965 <sub>o</sub>	1/8	1/32	1	1/16
	965 <sub>p</sub>	1/8	1/16	1/4	1
		Titolo inibente del siero			
II Ulteriori passaggi senza siero	PR8 <sub>c</sub>	2560	320	320	40
	PR8 <sub>g</sub>	5120	5120	80	160
	965 <sub>o</sub>	320	80	2560	160
	965 <sub>p</sub>	1280	160	1280	5120
		Rapporto dei titoli			
	PR8 <sub>c</sub>	1	1/8	1/8	1/64
	PR8 <sub>g</sub>	1	1	1/64	1/32
	965 <sub>o</sub>	1/8	1/32	1	1/16
	965 <sub>p</sub>	1/4	1/32	1/4	1

\* I simboli sono identici a quelli usati nella tavola VIII.

*Caratteristiche antigeniche di SH e 956 dopo passaggio con siero immune eterologo.* Una serie di esperienze simili a quelle sopra descritte vennero pure fatte con SH e 965. Questo paio di virus venne scelto perchè essi si comportavano in modo molto diverso sia nelle reazioni di neutralizzazione crociata come in quella di inibizione crociata dell'emoagglutina-

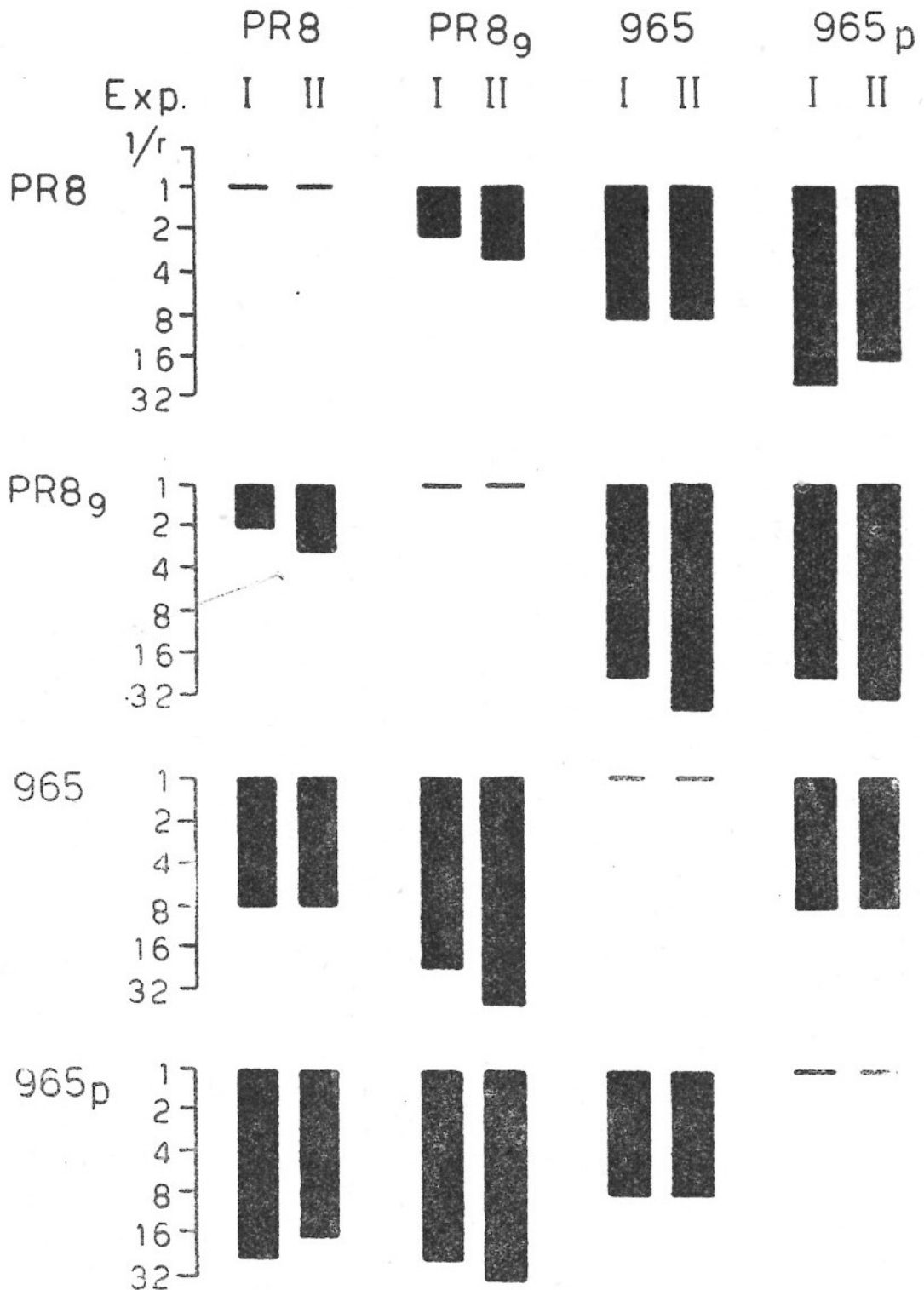


Fig. 4. — Estensione delle reazioni di inibizione crociata della emoagglutinazione con PR8, 965, e le varianti da essi derivate mediante passaggi seriali *in ovo* in presenza di siero immune eterologo. I titoli dei sieri ed i rapporti dei titoli sono raccolti nella Tav. IX.

zione, come appare evidente dai risultati raccolti nelle Tav. I e II. Scopo di queste prove era di dimostrare se varianti antigeniche potessero essere ottenute da ceppi notevolmente diversi, usando la stessa tecnica impiegata con ceppi più strettamente collegati.

Furono fatti 12 passaggi seriali con ciascuno dei virus, in presenza di siero immune contro l'altro ceppo. Le condizioni sperimentali e i passaggi di controllo furono identici a quelli usati nelle prove precedenti, ad

TAVOLA X

Reazioni serologiche crociate con SH, 965 e i sottoceppi ottenuti nei passaggi con siero immune eterologo.

S I E R O *	V I R U S *			
	SH <sub>c</sub>	SH <sub>9</sub>	965 <sub>c</sub>	965 <sub>s</sub>
	Titolo neutralizzante del siero			
SH <sub>c</sub>	40	80	0	0
965 <sub>c</sub>	2	0	160	160
	Rapporto dei titoli			
SH <sub>c</sub>	1	2	1,40	1/40
965 <sub>c</sub>	1/80	1/160	1	1
	Titolo neutralizzante del siero			
SH <sub>c</sub>	160	160	40	20
965 <sub>c</sub>	160	40	1280	640
	Rapporto dei titoli			
SH <sub>c</sub>	1	1	1/4	1/8
965 <sub>c</sub>	1/8	1/32	1	1/2

\* I simboli sono identici a quelli usati nelle altre tavole.

eccezione del fatto che, nel tentativo di ottenere almeno una parziale neutralizzazione, dopo i primi passaggi si mescolarono con il siero immune non diluito, piccolissime quantità di virus, precisamente  $10^{-7}$ . I risultati delle reazioni di neutralizzazione crociata e di inibizione crociata dell'emoagglutinazione con SH, 965 ed i sotto-ceppi ottenuti da essi sono raccolti nella Tav. X. In questa prova non vennero preparati i sieri immuni contro l'uno e l'altro dei ceppi dopo che essi furono passati in presenza degli antisieri eterologhi. Si ritenne che questo non fosse necessario quando l'esame dei rapporti dei titoli indicò che vi era solo ben poca evidenza di una differenza antigenica fra l'uno e l'altro dei sottoceppi ed i loro corrispondenti originali. Nella Fig. 5 sono rappresentati graficamente i risultati ottenuti dopo il calcolo del rapporto  $r$  mediante la funzione più sopra data. E' chiaro che non vi era alcuna differenza significativa tra SH e SH<sub>9</sub>, il sotto-ceppo derivato da SH dopo passaggio in presenza di siero anti-965. E' sembrato invece che si potesse pensare ad una certa diffe-

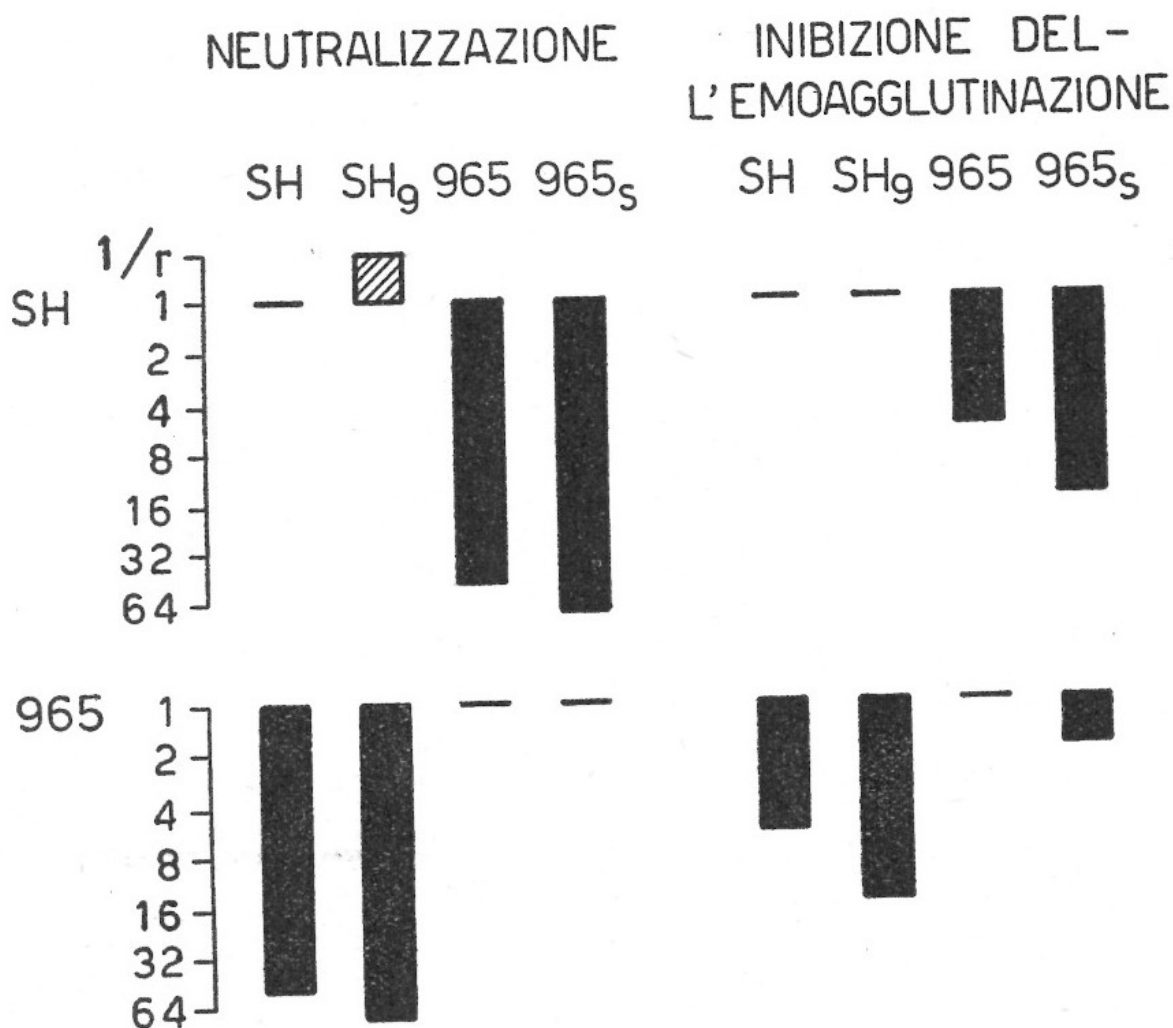


Fig. 5. — Estensione delle reazioni serologiche crociate *in ovo* ed *in vitro* con SH,965, e i sottoceppi da essi ottenuti mediante passaggi seriali *in ovo* in presenza di siero immune eterologo. I titoli dei sieri ed i rapporti dei titoli sono raccolti nella Tav. X.

renza antigenica tra 965 e 965<sub>s</sub>, il sottoceppo derivato da 965 passandolo in presenza di siero anti-SH. Poichè tale differenza risultò evidente solo mediante le reazioni di inibizione dell'emoagglutinazione e non si poterono effettuare a scopo di conferma le reazioni serologiche crociate mancando i sieri immuni contro i sotto-ceppi, è dubbio che sia stata ottenuta una variazione antigenica di qualche significato usando i ceppi SH e 965. Con ceppi così diversi come SH e 965, i quali non danno significativamente una neutralizzazione crociata *in ovo*, non si può dire anticipatamente che varianti antigeniche debbano emergere nelle condizioni sperimentali impiegate.

#### DISCUSSIONE

I virus influenzali sono suscettibili di variazioni nei riguardi di un certo numero di proprietà e dimostrano queste variazioni con una frequenza sorprendente in un vasto raggio di condizioni sperimentali. Così è stata ottenuta chiara evidenza di variazione relativamente alla patogenicità per varie specie di animali di laboratorio, particolarmente per il furetto (27), topo (28), hamster (29) e embrione di pollo (18). Si hanno anche variazioni relative alla capacità di agglutinare i globuli rossi di pollo e quelli di cavia (30) e ciò è particolarmente evidente con ceppi di influenza tipo A (31). E' stata dimostrata una variazione riguardo alla rapidità di eluizione dagli eritrociti: tali varianti sono ottenute dopo trattamento con agenti fisici (raggi ultravioletti) o chimici (acetato di lantanio) (32). Con pochi ceppi si sono ottenute varianti notevolmente abnormi e patogene per il sistema nervoso centrale (33, 34). Fra tutte le proprietà che dimostrano variazioni, quella che attrae maggiormente l'attenzione è la variazione nella caratteristica antigenica. Infatti alterazioni marcate nella struttura antigenica dei virus fanno sorgere problemi di alto interesse teorico, che hanno anche ovviamente un valore pratico relativo alla identificazione, classificazione ed immunizzazione.

Variazioni nella costituzione antigenica dei virus influenzali si possono avere quando venga cambiata la specie ospite e una prolungata serie di passaggi venga effettuata in un nuovo ospite. Vi sono argomenti che questo possa avvenire quando l'embrione di pollo (18), culture di tessuto embrionale (16, 17) o topolino (19, 21) siano sostituiti con altre specie ospiti. Sono stati raccolti dati di notevole evidenza di una variazione antigenica durante il così detto adattamento del virus al polmone di topo: dati sufficienti per rendere dubbio che la costituzione antigenica di un ceppo adattato al topolino sia un valido elemento per indicare la caratteristica antigenica del ceppo originale (19). Come è stato sottolineato da HIRST (19), il paragone delle caratteristiche antigeniche di differenti ceppi adattati al

topolino oppure di tali ceppi con ceppi adattati all'uovo, può portare a notevoli errori di affermazione di differenze antigeniche.

Sembra notevolmente probabile che variazioni nella costituzione antigenica avvengano anche nella trasmissione naturale del virus influenzale da uomo a uomo. Questa supposizione è suffragata da un precedente lavoro <sup>(10)</sup> come anche dall'evidenza presentata in questo studio che ceppi di influenza A isolati in annate diverse e mantenuti solamente nell'embrione di pollo per pochi passaggi, mostrano notevoli differenze antigeniche. Che queste differenze non fossero dovute al piccolo numero di passaggi effettuati, sembra probabile dai risultati che si ebbero in numerose serie, in cui almeno 12 passaggi seriali di controllo nell'embrione non determinarono alcuna alterazione dimostrabile nella caratteristica antigenica di alcuno dei tre ceppi adattati all'uovo. Questo punto di vista è sostenuto anche dall'evidenza, ora notevole, che la maggior parte dei ceppi adattati all'uovo ed isolati da una singola epidemia sono strettamente correlati <sup>(5,9,10)</sup>, come anche dal fatto che ripetuti isolamenti nell'uovo del virus da un unico paziente forniscono ceppi che appaiono indistinguibili.

Se l'apparire di una variante a costituzione antigenica diversa da quella del ceppo originale del virus è il risultato di variazione spontanea, analoga al fenomeno di mutazione che si ha nelle specie microbiche, ci si attende che la variante sostituisca il ceppo originale ogni volta che l'ospite favorisca in modo preferenziale la moltiplicazione della variante stessa. Sembra inoltre che la costituzione antigenica della variante dominante debba rimanere come un carattere fisso e trasmissibile fino a che si origini un'altra variante che potrebbe prendere il posto della prima. Un mezzo per favorire la selezione di una variante a costituzione antigenica diversa è quello di istituire condizioni tali per cui, quando un grande numero di particelle virali venga inoculata, una grande proporzione di esse venga neutralizzata dagli anticorpi, ma quelle particelle varianti che reagiscono meno con gli anticorpi rimangano capaci di moltiplicarsi. Che tale procedimento sia effettuabile e conduca all'emergenza di ceppi con costituzione antigenica differente da quella dei ceppi originali, sembra confermato dai risultati di questo studio.

I dati ottenuti indicano che ceppi i quali siano correlati, nel limite che essi dimostrino una neutralizzazione crociata apprezzabile, danno origine a varianti antigeniche, allorchè si passino in presenza di siero immune eterologo. Sembra evidente che tali varianti mantengano le loro nuove caratteristiche antigeniche effettuando i passaggi in assenza delle condizioni che ne hanno causato la selezione. Resta da determinare quanto a lungo possano persistere le nuove caratteristiche. Il fatto che si possa predire la costituzione antigenica della variante, non deve essere consi-

derato come una indicazione di una capacità limitata da parte del virus a subire variazioni, ma con tutta probabilità è semplicemente il riflesso della specificità del siero immune usato per produrre le condizioni di selezione. Già precedentemente si era ottenuta la dimostrazione di una variazione prevedibile con virus influenzale trattato con raggi ultravioletti o acetato di lantanio (<sup>32</sup>), come pure con il virus della parotite epidemica, per quanto si riferisce all'inibizione della moltiplicazione, usando il polisaccaride della capsula del bacillo di FRIEDLÄNDER (<sup>35</sup>).

Probabilmente non c'è nei virus influenzali una costituzione antigenica fissa, che non vada soggetta a variazioni. Dal ceppo PR8, che ha subito dal momento del suo isolamento nel 1934, centinaia di passaggi in numerose specie, è stata ottenuta una variante antigenica con la stessa facilità con cui si è ottenuta da uno qualsiasi degli altri ceppi che sono stati sottoposti soltanto a pochi passaggi in un unico ospite. Sembra probabile che usando la tecnica impiegata in questo studio, si possano ottenere varianti antigeniche da ogni ceppo e che nuove varianti possano venire selezionate da quelle originate inizialmente. Resta da stabilire se tale selezione scalare di varianti possa rendere possibile lo sviluppo di un ceppo del tipo A primo da un tipico ceppo A o viceversa.

Il fatto che le dissimiglianze antigeniche fra i ceppi originali come anche fra questi ceppi e le varianti da essi derivate fossero sia qualitativamente che quantitativamente differenti nelle prove di neutralizzazione crociata rispetto alle prove di inibizione crociata della emoagglutinazione, costituisce una nuova evidenza per il concetto (<sup>25</sup>) che gli anticorpi misurabili mediante la tecnica *in vivo* non sono identici a quelli misurabili con la tecnica *in vitro*.

Nuova York, Rockefeller Institute for Medical Research, 20 luglio 1950.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) MAGILL, T. P., and FRANCIS, T., Jr., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1936, 35, 463.
- (<sup>2</sup>) MAGILL, T. P., and FRANCIS T., Jr., Brit. J. Exp. Path., 1938, 19, 273.
- (<sup>3</sup>) FRANCIS, T., J., and MAGILL, T. P., Brit. J. Exp. Path., 1938, 19, 284.
- (<sup>4</sup>) SMITH, W., and ANDREWES, C. H., Brit. J. Exp. Path., 1938, 19, 293.
- (<sup>5</sup>) HIRST, G. K., J. Exp. Med., 1943, 78, 407.
- (<sup>6</sup>) FRIEDEWALD, W. F., J. Exp. Med., 1944, 79, 633.
- (<sup>7</sup>) MAGILL, T. P., and SUGG, J. Y., J. Exp. Med., 1944, 80, 1.
- (<sup>8</sup>) MAGILL, T. P., and SUGG, J. Y., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1943, 53, 104.
- (<sup>9</sup>) HIRST, G. K., J. Exp. Med., 1947, 86, 367.
- (<sup>10</sup>) TAYLOR, R. M., Am. J. Pub. Health, 1949, 39, 171.

- (11) RASMUSSEN, A. F., STOKES, J. C., and SMADEL, J. E., *Am. J. Hyg.*, 1948, 47, 142.
- (12) KALTER, S. S., CHAMPMAN, O. D., FEELEY, D. A., and MACDOWEL, S. L., *J. Immunol.*, 1948, 59, 147.
- (13) HILLEMANN, M. R., MASON, R. P., and ROGERS, N. G., *Pub. Health Rep., U.S.P.H.S.*, 1950, 65, 171.
- (14) SALK, J. E., and SURIANO, P. C., *Am. J. Pub. Health*, 1949, 39, 345.
- (15) FRANCIS, T., Jr., SALK, J. E. and QUILLIGAN, J. J., *Am. J. Pub. Health*, 1947, 37, 1013.
- (16) MAGILL, T. P., and FRANCIS, T., Jr., *J. Exp. Med.* 1936, 63, 803.
- (17) STUART-HARRIS, C. H., *Brit. J. Exp. Path.*, 1943, 24, 33.
- (18) BURNET, F. M., and BULL, D. R., *Australian J. Exp. Biol. and Med. Sc.*, 1944, 22, 173.
- (19) HIRST, G. K., *J. Exp. Med.* 1947, 86, 357.
- (20) FRANCIS, T., Jr., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1947, 5, 143.
- (21) SUGG, J. Y., *J. Bact.*, 1949, 58, 399.
- (22) RICKARD, E. R., LENNETTE, E. H., and HORSFALL, F. L., Jr., *Pub. Health Rep., U.S.P.H.S.*, 1940, 55, 2146.
- (23) HIRST, G. K., *J. Immunol.*, 1942, 45, 285.
- (24) HIRST, G. K., *J. Exp. Med.*, 1942, 75, 49.
- (25) WALKER, D. L., and HORSFALL, F. L., Jr., *J. Exp. Med.*, 1950, 91, 65.
- (26) BURNET, F. M., and LUSH, D., *Australian J. Exp. Biol. and Med. Sc.* 1940, 18, 49.
- (27) FRANCIS, T., Jr., and MAGILL, T. P., *J. Exp. Med.*, 1935, 62, 505.
- (28) ANDREWES, C. H., LAIDLAW, P. P., and SMITH, W., *Lancet*, 1934, 2, 859.
- (29) FRIEDEWALD, W. T., and HOOK, E. W., Jr., *J. Exp. Med.*, 1948, 88, 343.
- (30) BURNET, F. M., *Australian J. Sc.*, 1942, 5, 81.
- (31) BURNET, F. M., STONE, J. D., ISAACS, A., and EDNEY, M., *Brit. J. Exp. Path.*, 1949, 30, 419.
- (32) BJØRKMAN, S. E., and HORSFALL, F. L., Jr., *Exp. Med.*, 1948, 88, 445.
- (33) STUART-HARRIS, C. H., *Lancet*, 1939, 1, 497.
- (34) FRANCIS, T., Jr., and MOORE, A. E., *J. Exp. Med.*, 1940, 72, 717.
- (35) GINSBERG, H. S., and HORSFALL, F. L., Jr., *J. Exp. Med.*, 1949, 90, 393.
-