

5. S. PAULUZZI e A. FELICI. — L'infezione cellulare da virus ECHO 9 studiata con la tecnica degli anticorpi fluorescenti.

Riassunto. — E' stata studiata con la tecnica degli anticorpi fluorescenti l'infezione di cellule di rene di scimmia con virus ECHO 9, ceppo Vispo. Il ciclo di sviluppo e la distribuzione dell'antigene virale specifico corrispondono a quelli osservati con altri enterovirus.

Summary. — The infection of monkey kidney cells by ECHO 9 virus, strain Vispo, was studied with the fluorescent antibody technique. The development cycle and distribution of viral antigen correspond to those observed with other enteroviruses.

Il virus ECHO 9 ceppo Vispo è stato isolato per la prima volta in Italia, nelle Marche, durante l'epidemie di meningo-nevrassite dell'estate e autunno 1955; la sua patogenicità è stata chiaramente dimostrata sia dalle indagini epidemiologiche eseguite in Italia, sia dal suo isolamento negli anni successivi da numerosi casi clinici in corso di epidemie di meningite sierosa occorse in tutto il mondo (², ⁹). Il ceppo Vispo del virus ECHO 9 è patogeno per il topino neonato, ha un rapido ciclo di sviluppo e un rapido assorbimento cellulare in colture di rene di scimmia (¹). Esso si differenzia dal virus ECHO 9 ceppo Hill, isolato nel 1953 da materiale fecale di bambini sani, il quale pur essendo neutralizzato dagli stessi sieri dell'ECHO 9 Vispo, non è patogeno per il topino neonato, non dà malattia nell'uomo, ha un ciclo di sviluppo in rene di scimmia molto lento, con lento adsorbimento cellulare (¹).

Abbiamo voluto controllare la velocità di comparsa e la distribuzione cellulare della proteina virale nelle cellule di rene di scimmia infettate con virus ECHO 9, ceppo Vispo, a vari intervalli di tempo dalla inoculazione.

MATERIALI E METODI

Virus: E' stato impiegato per l'inoculazione in colture cellulari il virus ECHO 9 ceppo Vispo, isolato nelle Marche durante l'epidemia di meningonevrassite dell'estate e autunno 1955 (²).

Il ceppo di virus è stato purificato mediante tre passaggi successivi

su placca e quindi concentrato, mediante centrifugazione a 40.000 r.p.m. per 1 h. con ultracentrifuga Spinco refrigerata, fino a 10^{10} PFU/ml.

Antisieri: Sono stati impiegati sieri umani positivi per l'ECHO 9 con titoli di anticorpi neutralizzanti varianti da 1:80 e 1:300, ottenuti da soggetti umani nel corso dell'epidemia di ECHO 9 verificatasi nel 1959 in provincia di Mantova (¹⁴).

Questi antisieri sono stati usati alla diluizione 1:5 in soluzione isotonica di tampone fosfatico a pH = 7,2.

Gammaglobuline fluorescenti: Le gammaglobuline fluorescenti di cavallo immunizzato contro le proteine umane (gammaglobuline di cavallo coniugate con l'isocianato di fluorescina) sono state ottenute dalla Sylvana Chemical Co. di New-Jersey (U.S.A.). Prima dell'impiego esse sono state diluite 1:5 in tampone fosfato a pH = 7,2 e successivamente sottoposte a due adsorbimenti, di 30' l'uno, in termostato a 37° su polvere di fegato di topo e su polvere di rene di scimmia (*macacus rhesus*) ottenute mediante estrazione acetonica secondo il procedimento di COONS (⁵).

Durante l'adsorbimento la sospensione è stata mantenuta in movimento in un agitatore contenuto nel termostato. Ogni adsorbimento è stato eseguito con 100 mg di polvere per ogni cm³ di siero fluorescente indiluito. La polvere di fegato di topo e di rene di scimmia è stata rimossa mediante centrifugazione a 5000 r.p.m. per 15'.

Culture di cellule di rene di scimmia: Sono state impiegate delle colture in vitro di cellule di rene di scimmia (*Macacus rhesus*) preparate mediante tripsinizzazione secondo il metodo di DULBECCO e VOGT, modificato da YOUNGNER (¹³).

Come terreno di crescita è stato usato il terreno di KRET (⁷) leggermente modificato, contenente 87 parti di soluzione di Hanks, 3 di siero di vitello e 10 di idrolisato di lattalbumina al 5%, con 100 unità di penicillina e 100 µg di streptomycin per cm³. Per il mantenimento, quando le cellule erano confluite a formare uno strato continuo, è stata impiegata la soluzione di Earle senza siero e con il 0,5% di idrolisato di lattalbumina.

Le cellule sono state distribuite in tubi di Leighton contenenti nell'apposito ricettacolo un coprioggetto di 16 mm x 24 mm e incubate per 4-6 giorni a 37°C fino alla formazione di un tappeto cellulare continuo. Si procedeva quindi al cambio del terreno di crescita con quello di mantenimento.

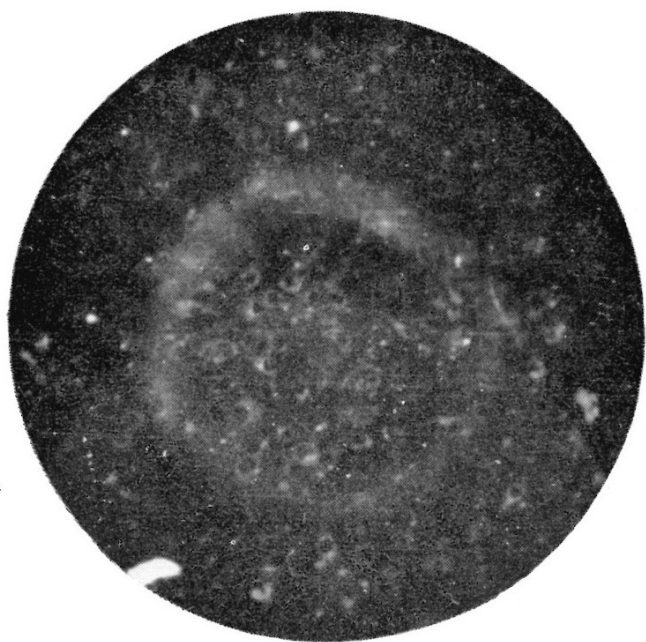


Fig. 1

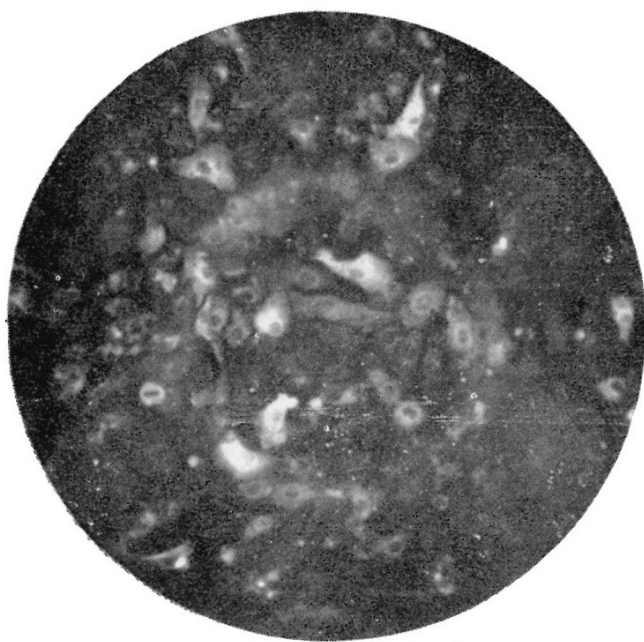


Fig. 2

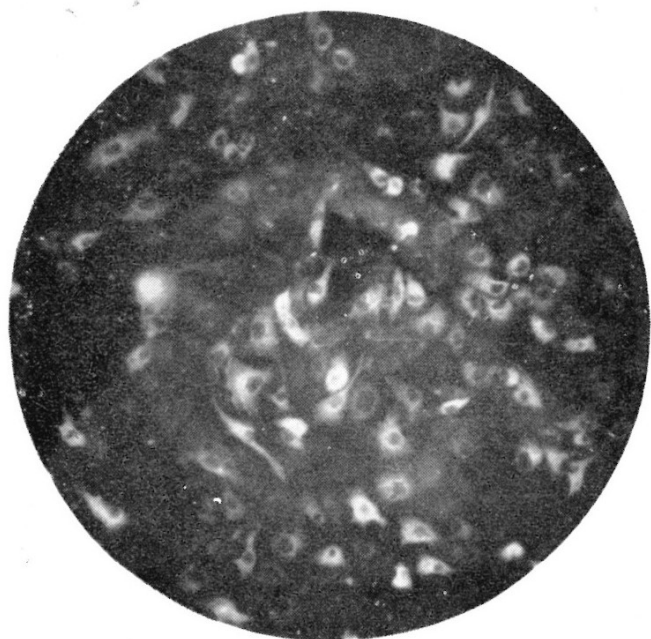


Fig. 3

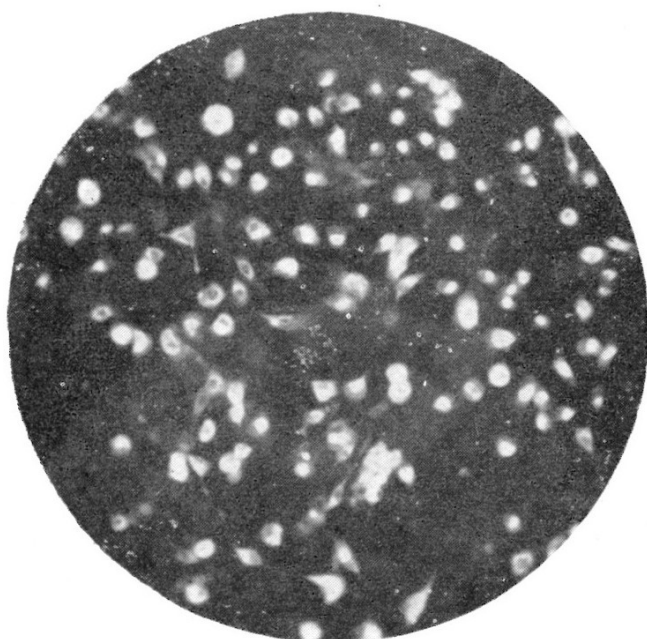


Fig. 4

Fig. 1 — Cellule di rene di scimmia non infette trattate con siero anti-Vispo e anticorpi fluorescenti. Presenza di modesta autofluorescenza. x 80

Fig. 2 — Cellule di rene di scimmia infettate con ECHO 9 alla 4^a ora dalla inoculazione. Alcune cellule legano l'anticorpo fluorescente. x 80

Fig. 3 — Idem. 5^a ora dall'inoculazione del virus. x 80

Fig. 4 — Idem. 7^a ora dall'inoculazione del virus. x 80

Fig. 5 — Cellula di rene di scimmia non infetta trattata con siero fluorescente, a maggiore ingrandimento: è presente solo una debole autofluorescenza. x 600

Fig. 6 — 4^a ora dall'inoculazione del virus. Presenza di antigene virale in due cellule, a distribuzione perinucleare e con un aspetto pulverulento. Il nucleo non è deformato e non è fluorescente. a) Due cellule che non hanno assunto la fluorescenza specifica. x 600

Fig. 7 — 5^a ora dall'inoculazione del virus. La fluorescenza si è fatta più intensa, assumendo un aspetto granuloso attorno al nucleo. In a) una cellula senza fluorescenza specifica. x 600

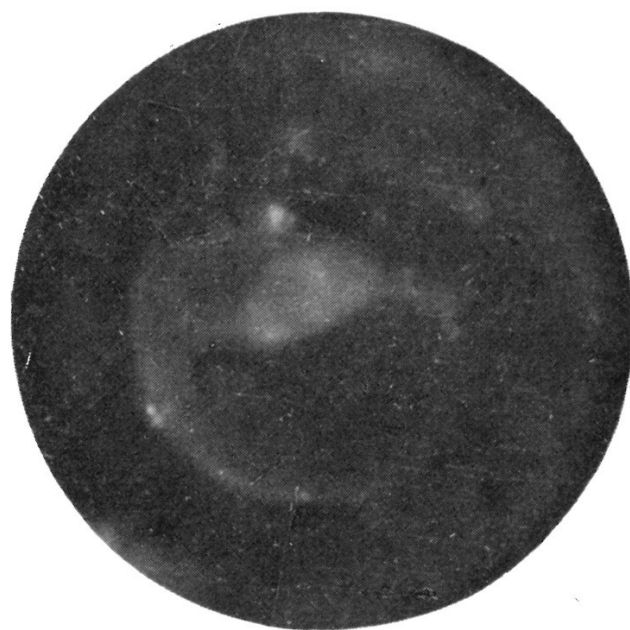


Fig. 5

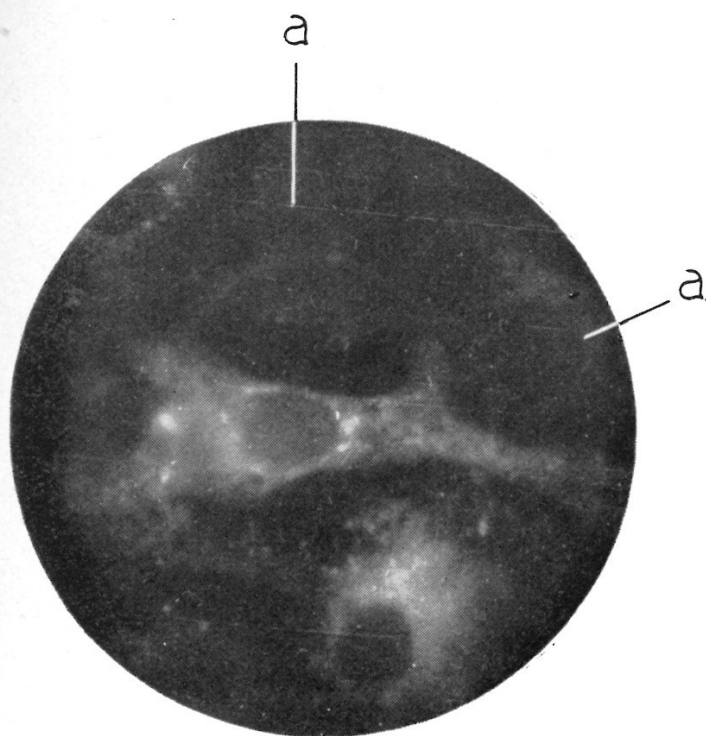


Fig. 6

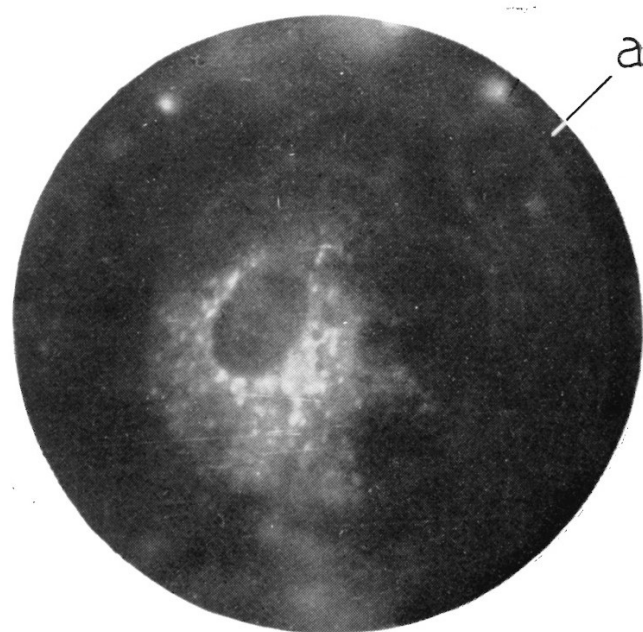


Fig. 7

Fig. 8 — 5^a ora di infezione. La fluorescenza a granuli ben evidenti e irregolari è diffusa a tutto il citoplasma della cellula trinucleata. x 600

Fig. 9 — 6^a ora di infezione cellulare. I nuclei cominciano a deformarsi, si inizia la formazione di una zona di fluorescenza compatta iuxta o perinucleare (b). Nel citoplasma periferico sono evidenti gocciole e granuli fluorescenti. In a) una cellula senza fluorescenza specifica. x 600

Fig. 10 — Cellula alla 6^a ora di infezione, di forma rotondeggiante, con nucleo lateralizzato, zona di fluorescenza compatta iuxtanucleare al centro della cellula e grosse gocciole fluorescenti nel citoplasma periferico; queste ultime mostrano un punto opaco nel loro centro. x 600

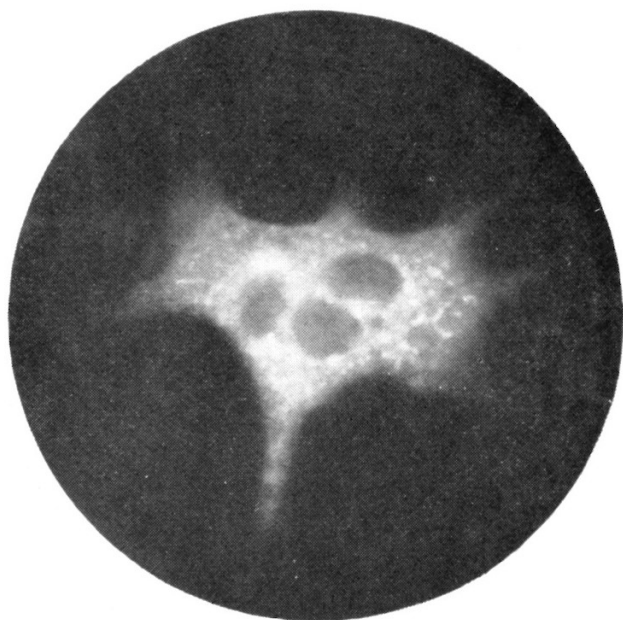


Fig. 8

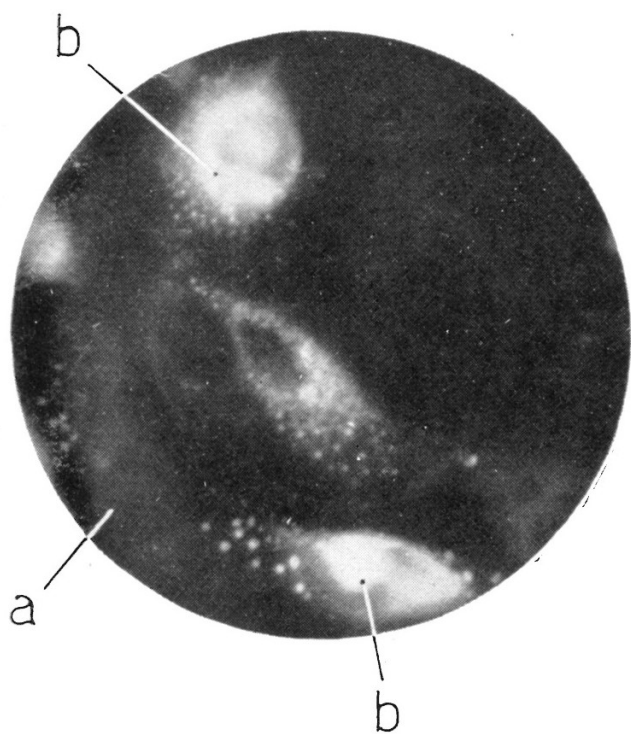


Fig. 9

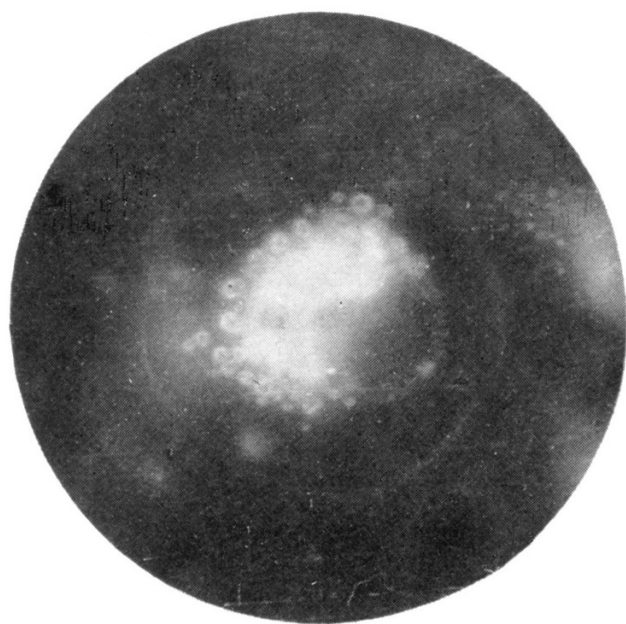


Fig. 10

Fig. 11 — 7^a ora di infezione. Cellule picnotiche, nucleo deformato e lateralizzato, grossa zona di fluorescenza compatta iuxtannucleare, qualche granulo nel restante citoplasma. x 600

Fig. 12 — 7^a ora di infezione. Cellule picnotiche, nuclei deformati e picnotici senza fluorescenza specifica, grossa zona compatta di fluorescenza al centro della cellula, citoplasma residuo con fluorescenza più debole. x 600

Figg. 13 e 14 — La stessa cellula alla 7^a ora di infezione con virus ECHO 9 (Vispo), colorata con gli anticorpi fluorescenti e controcolorata con ematossilina-eosina. Al centro della cellula si nota il nucleo picnotico e deformato. Inclusione eosinofila perinucleare (*fig. 14*), intensamente colorata con gli anticorpi fluorescenti (*fig. 13*), grosse gocce fluorescenti nel citoplasma periferico, cui corrispondono delle formazioni di aspetto vacuolare dopo colorazione con ematossilina-eosina. x 600



Fig. 11



Fig. 12

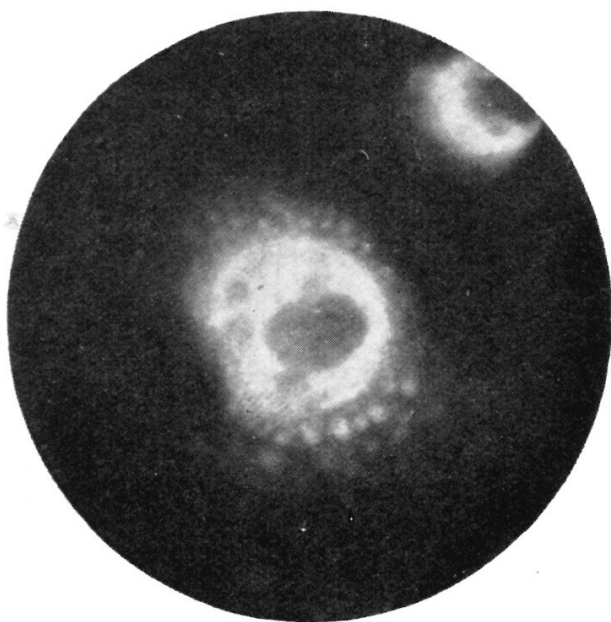


Fig. 13

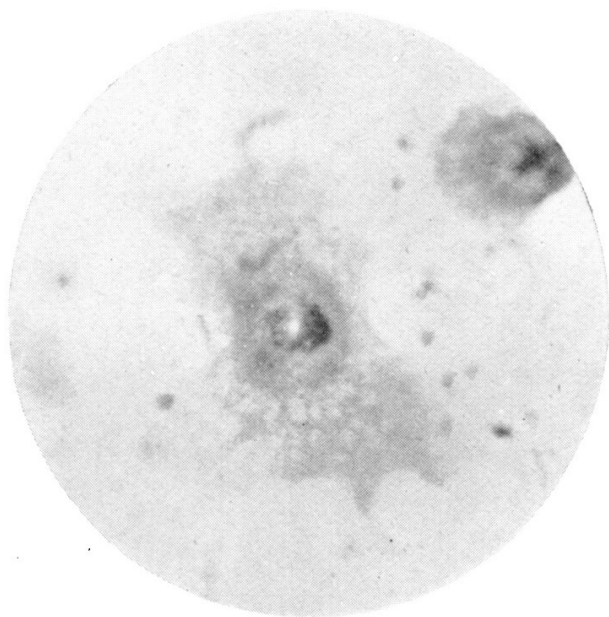


Fig. 14

Figg. 15 e 16 — Coltura di rene di scimmia dopo 7 ore dall'inoculazione di ECHO 9, colorata con gli anticorpi fluorescenti e con ematossilina-eosina. Le cellule inquadrare al centro della fotografia si trovano, ingrandite, nelle figg. 17 e 18 x 80 (fig. 15); x 100 (fig. 16).

Figg. 17 e 18 — Idem, a maggiore ingrandimento. Anche qui si nota il nucleo picnotico della cellula isolata, al centro dei fotogrammi, la inclusione eosinofila iuxtannucleare fluorescente, il citoplasma periferico con fluorescenza a granuli, cui corrispondono, alla controcolorazione con ematossilina-eosina, dei piccoli vacuoli. x 600

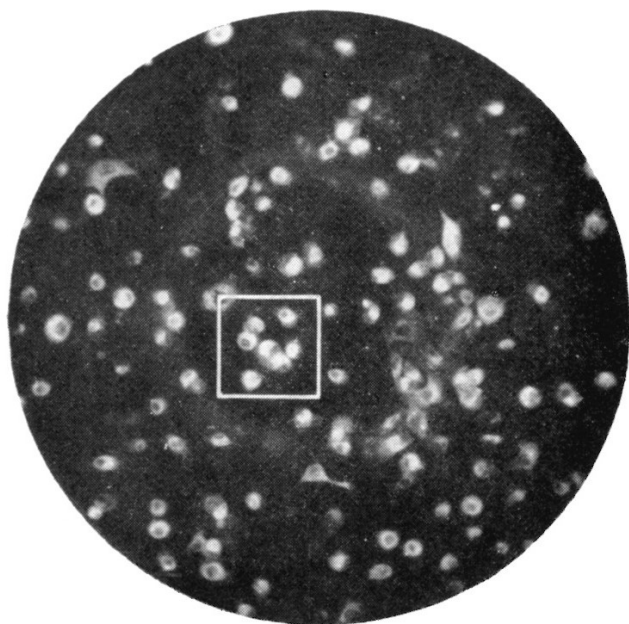


Fig. 15

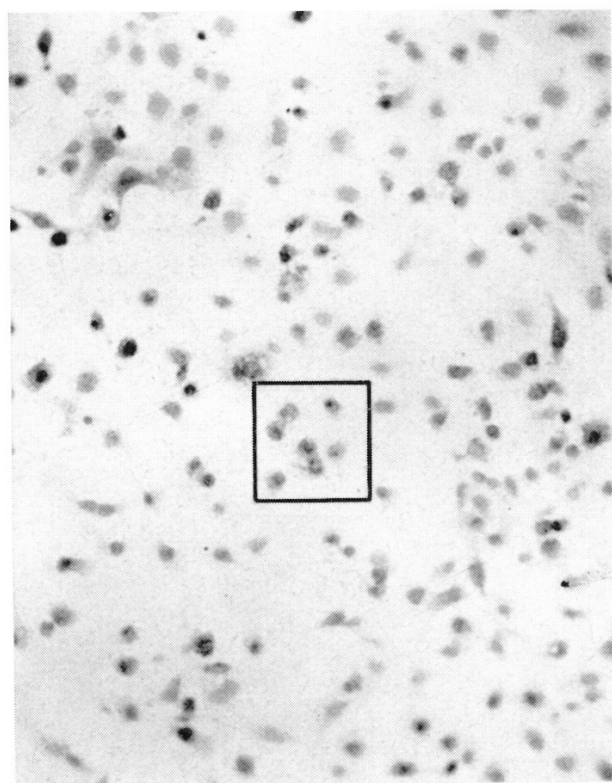


Fig. 16

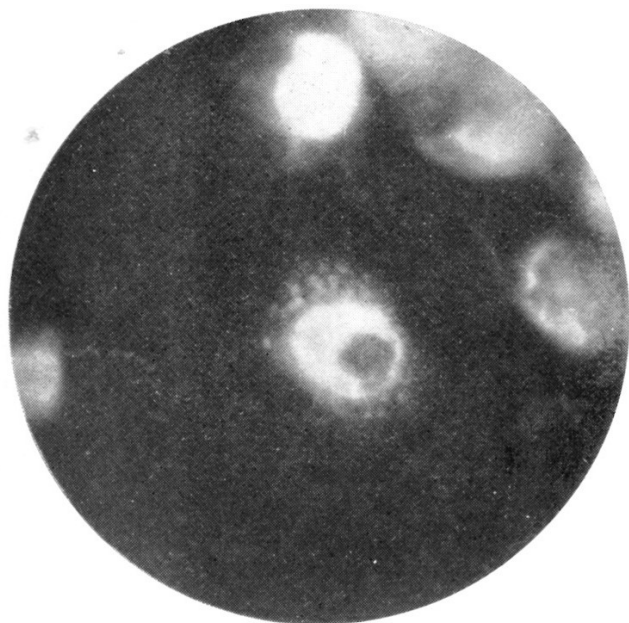


Fig. 17

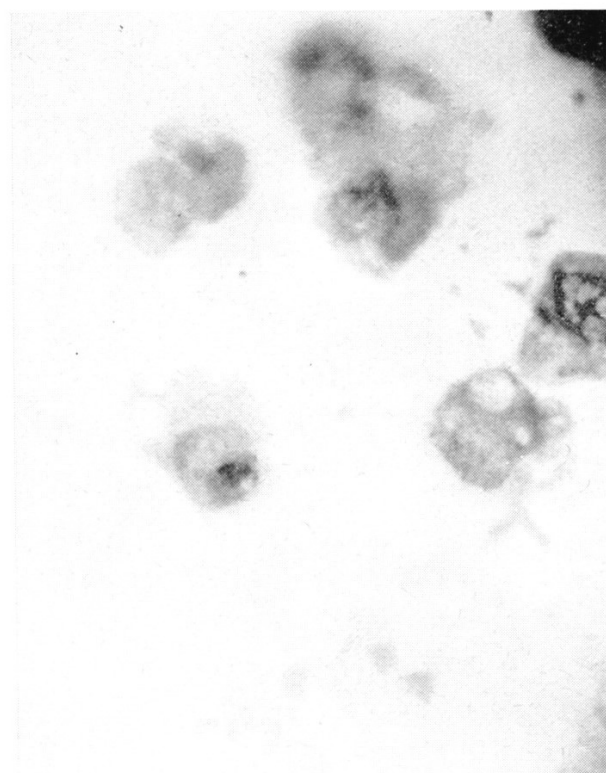


Fig. 18

Infezione delle colture: In un gruppo di tubi sono state staccate dal vetrino coprioggetto le cellule mediante trattamento con soluzione tamponata di versene (EDTA) al 2‰ ed è stata eseguita la loro conta previa colorazione con cristalvioletto ⁽⁸⁾ in camera di Buerker. Il contenuto medio per tubo è risultato di 220.000 cellule. Impiegando il virus concentrato con l'ultracentrifuga, sono state inoculate $8,8 \cdot 10^6$ PFU (unità placca) di ECHO 9 per tubo, con una molteplicità di inoculo di circa 40 PFU per cellula. Le colture sono state quindi di nuovo incubate a + 37°C.

Allestimento dei preparati: Ad intervalli di tempo regolari (1h., 2h., 3h., 4h., 5h., 6h., 7h.), sono stati prelevati dai tubi, previo lavaggio con soluzione tampone, due vetrini coprioggetto per volta, sottoponendoli quindi al seguente procedimento di fissazione:

essiccamento per 30' in termostato a + 37°C sotto l'azione di un ventilatore;

fissazione in acetone anidro Merck per 10';

evaporazione dell'acetone per 20' in termostato a + 37°C.

I vetrini così fissati sono stati quindi conservati in ghiacciaia a — 20°C fino al momento della colorazione.

Per la colorazione con gli anticorpi fluorescenti è stato seguito il metodo di stratificazione indiretta secondo la tecnica di WELLER e COONS ⁽¹²⁾.

Sui preparati, posti in una capsula di Petri assieme a cotone umido per evitare l'evaporazione, veniva innanzitutto stratificato l'antisiero anti-ECHO 9 per 30' a temperatura ambiente. Si procedeva quindi alla rimozione delle gammaglobuline ancora libere mediante un lavaggio in soluzione tampone di fosfati della durata di 10' con due cambi.

Sui vetrini veniva successivamente stratificato il siero fluorescente sempre per 30' a temperatura ambiente. Le gammaglobuline fluorescenti libere, venivano poi rimosse con un lavaggio in tampone fosfato (3 cambi) della durata di 10', dopodichè i preparati venivano montati in glicerina tamponata a pH 7,2 e sottoposti ad esame.

Le cellule fluorescenti osservate al microscopio a raggi UV venivano fotografate e quindi marcate con un oculare a punta di diamante onde facilitarne la identificazione, quindi, terminata la osservazione in fluorescenza, il preparato veniva sottoposto a colorazione con ematossilina-eosina.

Controlli: Sono stati allestiti preparati di controllo di cellule di rene di scimmia non inoculate con virus ECHO 9 sottoposti alla medesima tecnica di colorazione impiegata per il materiale infetto.

Un altro controllo era rappresentato dalla sostituzione del siero specifico anti-ECHO con altro siero umano privo di anticorpi per questo virus. Un terzo controllo veniva allestito stratificando sugli strisci, in sostituzione del siero fluorescente, alcune gocce della soluzione tampone.

Tutti i controlli sono risultati sempre negativi, era solamente presente l'autofluorescenza tessutale a tonalità giallo-arancione chiaramente distinguibile da quella specifica di colore giallo-verde.

Attrezzatura ottica: Abbiamo impiegato un complesso microscopico Zeiss per esami a luce fluorescente. La sorgente luminosa era una lampada a vapori di mercurio OSRAM tipo HBO 200. I filtri di eccitazione impiegati erano due Schott BG 12 dello spessore di 3 mm; i filtri di arresto erano marcati Schott CG 4 e CG 5 con bande di trasmissione attorno ai 5000 Å.

RISULTATI

Dopo l'infezione con alta molteplicità d'inoculo delle cellule di rene di scimmia con virus ECHO 9 (Vispo), nelle ore successive si sono rilevati i seguenti fenomeni:

1^a-3^a ora: Non si nota nessuna differenza nei preparati infettati rispetto ai controlli. Manca ogni traccia di fluorescenza specifica per antigeni virali nelle cellule (figg. 1 e 5).

4^a ora: Compare in circa il 20% delle cellule una fluorescenza specifica non omogenea: essa ha infatti un aspetto finemente granuloso, polverulento e appare iniziarsi nel citoplasma attorno al nucleo, che in questo stadio non si mostra raggrinzito o deformato ed è completamente privo di fluorescenza specifica (figg. 2 e 6).

5^a ora: Si accentua l'intensità della fluorescenza; i granuli di antigene acquistano maggiori dimensioni, rimanendo localizzati sempre, a preferenza, nella parte centrale della cellula; i nuclei non appaiono ancora deformati; aumenta il numero delle cellule interessate dallo sviluppo del virus (40% circa) (figg. 3, 7, 8).

6^a ora: Le cellule con fluorescenza specifica raggiungono circa il 60% della popolazione globale. Il nucleo comincia a deformarsi, a diventare picnotico e a spostarsi dal centro alla periferia della cellula, ma appare sempre privo di antigene virale. La intera cellula comincia a retrarsi, a perdere i prolungamenti citoplasmatici e a farsi globosa (figg. 4, 9 e 10).

La fluorescenza specifica è localizzata esclusivamente nel citoplasma dove in questa fase si osservano due aspetti degni di nota:

a) una zona di fluorescenza più compatta iuxtannucleare, verso il centro della cellula;

b) un disseminio di punti e di gocce fluorescenti nel citoplasma periferico che invade anche gli estremi lembi del protoplasma delle cellule che ancora non si sono raggrinzite a palla (figg. 9 e 10). Le gocce sono ben distinte l'una dall'altra, a limiti netti e in taluni casi assumono dimensioni abbastanza notevoli (fino a 4μ ed oltre di diametro) e mostrano un'area puntiforme opaca nel loro centro (fig. 10).

7^a ora: L'80% circa delle cellule sono fluorescenti. Si accentuano la deformazione, la picnosi e lo spostamento verso la periferia del nucleo e le cellule colpite dal processo virale tendono sempre più ad assumere un aspetto globoso. La fluorescenza specifica è sempre assente dal nucleo.

La zona di fluorescenza omogenea aumenta di compattezza e forma una vera e propria inclusione iuxtannucleare o perinucleare, al centro della cellula. Va man mano riducendosi e scomparendo l'aspetto punteggiato della fluorescenza citoplasmatica (figg. 4, 11 e 12).

Alcuni preparati giunti alla 7^a ora di infezione sono stati fotografati, la zona ripresa dalla pellicola è stata marcata con punta di diamante e quindi i vetrini sono stati controcolorati con ematossilina-eosina (figure 13-18). Si osservano in tal modo più chiaramente la picnosi e la deformazione del nucleo e la zona di fluorescenza compatta perinucleare, cui corrisponde, nel preparato controcolorato con ematossilina-eosina, una inclusione relativamente omogenea, eosinofila. Nel citoplasma periferico alle gocce e ai punti di fluorescenza specifica corrispondono, dopo colorazione con ematossilina-eosina, delle gocce e dei punti più chiari, con l'aspetto di vacuoli.

FORMAZIONE DI ANTIGENE VIRALE E DI PARTICELLE VIRALI INFETTANTI.

Nel corso di esperienze preliminari ad ulteriori ricerche è stata seguita la produzione di nuovo virus infettante con il metodo delle placche (⁶), titolando sia il virus contenuto nelle cellule che quello presente nel supernatante. Si è visto che durante il periodo di latenza dell'infezione circa il 97% del virus ECHO 9 (Vispo) scompare. Tra la 3^a e la 5^a h il numero delle particelle infettanti contenute nelle cellule aumenta di circa 1000 volte, fino a superare la quantità di virus presente nel supernatante. Solo tra la 13^a e la 27^a ora d'infezione il titolo del virus intracellulare accenna a diminuire, mentre quello presente nel supernatante arriva ad una punta massima.

CONCLUSIONI

La tecnica di colorazione immuno-citologica con gli anticorpi fluorescenti permette di evidenziare, all'interno della cellula infetta da virus, i punti in cui viene neoformata la proteina virale, specifica nelle sue proprietà antigeniche. La tecnica degli anticorpi fluorescenti quindi esplora uno dei processi fondamentali di produzione dei virus all'interno della cellula, anche se da un lato non ci dà informazioni sulla sintesi degli acidi nucleici virali e sulla formazione di particelle virali complete.

All'esame con la tecnica degli anticorpi fluorescenti, il ciclo di sviluppo intracellulare del virus ECHO 9, ceppo Vispo, si dimostra in tutto e per tutto corrispondente a quello riscontrato con altri enterovirus [polio 1, 2, 3 (3, 4, 10) e Coxsackie B3 e B4 (II)]. Il nucleo della cellula infetta, va incontro a una progressiva picnosi, non mostra mai fluorescenza specifica, mentre sono intensamente fluorescenti alcune zone citoplasmatiche iuxta o perinucleari e, sempre nel citoplasma, delle formazioni granulari di dimensioni variabili. Ad esse, alla controcolorazione con ematossilina-eosina, corrispondono rispettivamente delle inclusioni eosinofile omogenee iuxtannucleari e dei vacuoli alla periferia del citoplasma. Man mano che l'infezione virale procede, si assiste ad una picnosi globale della cellula, che perde i prolungamenti citoplasmatici e diventa sferica e, salvo il nucleo, fluorescente in maniera omogenea.

La velocità di comparsa dell'antigene virale nelle cellule infettate con virus ECHO 9 (Vispo) è altrettanto, se non più rapida di quella del virus polio 1 (Mahoney), nello stesso sistema cellulare ⁽³⁾.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ARCHETTI I., DUBES G. R. e WENNER H. A. - Arch. Virusforsch., 9: 73 (1959).
- (2) ARCHETTI I., FELICI A., RUSSI F. e FUA C. - Scientia med. ital., 5: 321 (1956).
- (3) BUCKLEY S. M. - Arch. Virusforsch., 6: 388 (1956).
- (4) BUCKLEY S. M. - Am. J. Path., 33: 691 (1957).
- (5) COONS A. H., LEDUC E. H. e CONNOLLY J. M. - J. exp. Med., 102: 49 (1955).
- (6) HSIUNG G. D. e MELNICK J. L. - Virology, 1: 533 (1955).
- (7) KRET A. - Arch. Virusforsch., 6: 60 (1955).
- (8) MELNICK J. L. - in: Diagnostic procedures for virus and rickettsial disease - Am. publ. Hlth. Ass. - N. Y. pag. 116 (1956).
- (9) MELNICK J. L. e SABIN A. B. - in: Rivers T. M., Horsfall F. L. - Viral and rickettsial infections of man - Pitman Med. Pub., London pag. 552 (1959).
- (10) ODDO F. G. - Giorn. microbiol., 4: 153 (1957).
- (11) PAULUZZI S. - Osservazioni personali.
- (12) WELLER T. H. e COONS A. H. - Proc. Soc. exp. Med., 98: 219 (1958).
- (13) YOUNGNER J. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 85: 202 (1954).
- (14) FELICI A. e ARCHETTI I. - Rivista Ist. sierot. mil. (in corso di pubblicazione).