

14. A. FELICI, D. BALDUCCI, L. CASTELLI, G. MANCINI, S. PAULUZZI, A. AU-REGGI, M. MILAZZO, G. KIRAY, R. SANTORO, E. STOFOROS, P. VERANI, R. VOZZA e G. PENSO. — **VIRUS 1959. - Sintesi dell'attività di ricerca eseguita nei Laboratori di Microbiologia dell'Istituto Superiore di Sanità.**

Riassunto. — Vengono riferiti i risultati concernenti l'attività svolta durante l'anno 1959 nella Sezione Virus del Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Superiore di Sanità.

Tali dati si riassumono nei seguenti punti:

a) Ricerche epidemiologiche: sono stati esaminati materiali biologici provenienti da ospedali, cliniche e istituti di ricerca per un complesso di 250 individui. Sono stati isolati 23 ceppi di virus coxsackie B₃, un ceppo di virus influenzale tipo B ed alcuni ceppi di virus ECHO 9.

b) Coltivazione del virus del tracoma. Si riferiscono i risultati di uno studio sull'adattamento del virus del tracoma in uova embrionate di pollo.

c) Esperimenti effettuati per valutare la rispondenza delle varie tecniche in uso, per titolare il potere antigene del vaccino antipolio.

d) Risultati e progressi tecnici ottenuti nello studio e nelle applicazioni delle colture di tessuto studiate nei seguenti aspetti particolari:

1) colture di cellule ottenute da frammenti di organo e da cellule mantenute a basse temperature;

2) perfezionamento delle tecniche per la coltura di cellule derivate dalla corteccia cerebrale di scimmia;

3) perfezionamento della tecnica delle colture cellulari sotto agar e sue applicazioni.

e) Metodo rapido di determinazione degli anticorpi neutralizzanti, con lettura al microscopio.

f) Ricerche orientative sul controllo dei chemioterapici antivirali.

Summary. — The results of the work performed during 1959 by the Virus section of the Microbiology Department of the Istituto Superiore di Sanità, are discussed. They may be summarised as follows.

a) Epidemiological studies. Biological materials submitted by hospitals, clinics and research institutes, taken from 250 individuals,

were examined. Twenty-three strains of Cox B₃ virus and one strain of influenza virus type B and several ECHO viruses type 9, were isolated.

b) Cultivation of trachoma virus. A study of adaptation of trachoma virus to chick embryos was carried out.

c) Experiments were performed to evaluate the correspondence of various techniques in use for the assay of the antigenic activity of antipoliomyelitis vaccines.

d) Results and technical progress in the study and applications of tissue culture studied especially from the following aspects:

1) Cell cultures obtained from portions of organs and cell suspension held at low temperatures.

2) Improvement of the technique for the culture of cells from the cerebral cortex of the monkey.

3) Improvement of the technique of cell culture under agar and its applications.

e) Rapid methods of determining neutralising antibodies, using microscopic readings.

Nel corso dell'anno 1959 presso la sezione virus del Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Superiore di Sanità si è attuato il seguente programma di lavoro:

1) Ricerche epidemiologiche.

2) Indagine sui metodi di controllo del potere antigene del vaccino per la poliomielite.

3) Progressi tecnici nello studio e nelle applicazioni delle colture di tessuti.

4) Perfezionamento dei metodi sierologici.

5) Ricerche orientative sul controllo dei chemioterapici antivirali.

1. - RICERCHE EPIDEMIOLOGICHE

A) ENTEROVIRUS: Alcuni episodi epidemici di « diarrea acuta » sono stati l'oggetto, nel 1959, di un particolare studio etiologico.

La sindrome diarroica, infatti, malgrado le estese ricerche che le

sono state dedicate, rimane ancora un problema etiologico dei più complicati. Noi stessi abbiamo avuto la possibilità di studiare in precedenti circostanze un focolaio epidemico ed alcuni casi sporadici verificatesi nel nostro Paese durante il 1956 ed il 1957 nei quali fu documentata una infezione da adenovirus (¹).

Attualmente, pur proseguendo la ricerca di un ipotetico agente patogeno quale responsabile precipuo di forme morbose di questa natura, l'attenzione è particolarmente attratta dalla necessità di definire l'importanza che i numerosi membri della famiglia degli enterovirus, il cui habitat naturale è appunto costituito dalla mucosa intestinale, possono rivestire nel determinismo etiologico della sindrome diarroica.

I due episodi studiati sono iniziati, il primo nella provincia di Mantova nel marzo ed il secondo nella provincia di Ancona nel giugno.

Provincia di Mantova: In tale provincia ci sono stati segnalati, nel periodo di tempo compreso tra il marzo ed il giugno, quattro episodi di « diarrea acuta ». Il primo, il più importante, iniziò nel marzo nel comune di Sermide. Nel mese successivo un analogo episodio si verificò nel comune di Carbonara Po. Quasi contemporaneamente casi di malattia analoga furono segnalati nel comune di Canneto sull'Oglio. Verso la fine di maggio forme simili vennero segnalate nel comune di Marmirolo e nella città di Mantova.

Nel periodo di tempo compreso tra il 12 marzo ed il 30 maggio, sono stati complessivamente riferiti 109 casi di malattia, 87 dei quali vennero studiati dal punto di vista epidemiologico: e su 53 furono eseguite ricerche virologiche (tentativi di isolamento di virus e ricerca sierologica).

L'indagine virologica ha stabilito per l'episodio di Canneto sull'Oglio, una etiologia da virus Coxsackie B 3: tre ceppi di tale virus sono stati infatti isolati mentre l'indagine sierologica (reazione di neutralizzazione) ha messo in evidenza in tutti i casi studiati un movimento immunitario specifico (ad eccezione di un caso con rialzo nel titolo anticorpale verso il virus ECHO 9). Gli episodi di Sermide e di Carbonara Po si sono presentati di interpretazione più complessa e l'indagine al riguardo, ancora in fase di svolgimento in collaborazione col Centro Virus di Milano, ha messo in evidenza casi di infezioni miste da virus ECHO 9 e virus ECHO 14 (²).

Provincia di Ancona: L'episodio è iniziato nel giugno nel Comune di Poggio San Marcello diffondendosi nei successivi mesi di luglio, agosto

e settembre a tutto l'abitato cittadino ed ai comuni vicini. In tale periodo di tempo si sono avuti 70 casi di malattia, tutti studiati dal punto di vista virologico. Una analoga ricerca è stata estesa a 67 conviventi sani. In questa occasione è stato messo in evidenza il ruolo etiologico di un ceppo di virus Coxsackie B 3: come dimostrato dall'isolamento di 16 ceppi di tale virus dai malati, rapportato all'isolamento di 4 ceppi dello stesso virus isolati dai conviventi sani.

L'indagine sierologica (reazione di neutralizzazione) condotta su 39 doppi campioni di siero ha chiaramente confermato l'importanza causale del virus isolato (³).

B) MIXOVIRUS: Nella seconda metà del mese di gennaio 1959, in Italia, così come nel resto dell'Europa e negli USA si è diffusa una epidemia di una forma respiratoria che ha colpito in prevalenza i bambini ed i giovani. L'entità del quadro clinico, le caratteristiche epidemiologiche, rendevano poco probabile una etiologia da virus influenzale di tipo A. A tale scopo sono stati studiati quattro focolai epidemici, quasi contemporanei, verificatisi il primo in una comunità di bambini (Senigallia, Ancona), i rimanenti in tre collettività militari (Nocera Inferiore, Avellino, Milano e Napoli).

L'indagine virologica (isolamento e ricerche sierologiche) condotta su 60 soggetti ha messo in evidenza il ruolo etiologico di un ceppo di virus influenzale tipo B.

Lo studio di focolai epidemici analoghi, verificatisi nelle città di Roma, Napoli, Modena e Milano, ha dimostrato anche in questi episodi il valore causale del virus di tipo B da noi isolato.

C) COLTIVAZIONE DEL VIRUS DEL TRACOMA: Si è iniziato lo studio dell'adattamento del virus del tracoma all'uovo embrionato utilizzando due ceppi (nell'intento di mettere in evidenza eventuali differenze antigeniche) l'uno isolato nello Stato di Israele e l'altro nell'Isola di Giava.

Inoculando nel sacco vitellino di uova al 6° giorno di incubazione, tali ceppi si ha una mortalità specifica dopo 5-8 giorni. La percentuale di mortalità riscontrata è stata del 49,5%.

Si è potuto constatare come ambedue i ceppi si sviluppino meglio in uova di galline alimentate in maniera naturale e non con diete sintetiche che contengono anche piccole quantità di antibiotici.

La preinoculazione di mg 0,2/uovo di acetato di cortisone eleva la mortalità degli embrioni di circa il 20%.

2. - INDAGINE SUI METODI DI CONTROLLO DEL POTERE ANTIGENE DEL VACCINO PER LA POLIOMIELITE PREPARATO CON VIRUS INATTIVATI

Per quanto concerne le fasi di controllo del vaccino della poliomielite, si può dire che vi è una discreta identità di vedute per il controllo di innocuità, mentre, ci sembra, che siano ancora molto discutibili i controlli di efficacia così come oggi si effettuano, perchè danno dei risultati non molto precisi e perchè le varie tecniche usate, si dimostrano scarsamente raffrontabili.

Abbiamo pertanto eseguite ricerche per mettere a confronto sistemi diversi di controllo allo scopo di facilitare l'orientamento della futura attività sulla valutazione del potere antigene dei vaccini per la poliomielite. E' stata anche eseguita una ricerca comparativa internazionale del potere antigene di due vaccini che sono stati inviati a vari laboratori affinché ciascuno ne determinasse con il proprio metodo il valore.

I laboratori che hanno aderito a tale ricerca, di cui è stato riferito al V Congresso Internazionale di Standardizzazione Biologica ⁽⁴⁾, sono:

- 1) National Institute of Health, *Bethesda*, U.S.A.
- 2) Institut Sérothérapique et Vaccinal Suisse, *Berna*, Svizzera.
- 3) Statens Seruminstitut, *Copenhagen*, Danimarca.
- 4) Hygiene Institut, *Freiburg*, Germania.
- 5) Industria-U.S.A.
- 6) Virologie. Universiteitsklimeken « St. Rafael », *Lueven*, Belgio.
- 7) Institut Merieux, *Lyon*, Francia.
- 8) Institute for Poliomyelitis Prophylaxis, *Moscow*, Russia.
- 9) Institut Pasteur, *Paris*, Francia.
- 10) Istituto Superiore di Sanità, *Roma*, Italia.
- 11) Statens Bakteriologiska Laboratorium, *Stockholm*, Svezia.

Per concludere possiamo dire che per migliorare tutto il sistema di produzione e di controllo dei vaccini per la poliomielite allestiti con virus inattivati è necessario seguire le seguenti tappe:

- 1) Adozione di un vaccino standard che sia identico nel maggior numero di laboratori del mondo, o di pochissimi standard, ufficialmente raffrontati l'uno all'altro con tutti i metodi che si riconoscono validi.

2) Comparazione internazionale dei metodi di controllo, che includa necessariamente anche bambini tripli negativi, onde poter arrivare a stabilire quale è il metodo sperimentale che più esattamente misura quella percentuale di particelle che hanno più alto potere antigene per l'uomo.

3) Produzione di vaccini che abbiano la più alta percentuale di particelle vaccinanti l'uomo.

3. - PROGRESSI TECNICI NELLO STUDIO E NELLE APPLICAZIONI DELLE COLTURE DI TESSUTI

A) COLTURE DI CELLULE OTTENUTE DA FRAMMENTI D'ORGANO MANTENUTI A BASSE TEMPERATURE. — Il grande interesse per il problema delle « banche di tessuti » destinati al trapianto omoplastico ci ha indotti allo studio, mediante colture, dello stato di sopravvivenza e vitalità degli elementi cellulari di organi sottoposti a perfrigerazione e conservati a bassa temperatura.

Le ricerche sono state eseguite su reni di *Macacus Rhesus*. Gli organi, subito dopo il prelievo, erano decapsulati e sottoposti, intieri oppure in pezzi di 2-3 mm³, all'azione perfrigerante di una miscela di etere-CO₂ solido, già portata alla minima temperatura (—78°C). Per proteggere le cellule viventi nel corso del congelamento veniva usata una soluzione di 10 parti di glicerina neutra e 90 parti di siero così ripartito: 50% di siero di vitello e 50% di siero di *Macacus Rhesus*. I pezzi di organo refrigerati erano poi conservati sterilmente in congelatore, alla temperatura di —35° C per una settimana circa. Gli organi venivano lasciati poi scongelare gradualmente a temperatura ambiente onde poter praticare l'allestimento delle colture mediante tripsinizzazione.

Sebbene le esperienze siano ancora alle prime fasi, si può tuttavia affermare che in tali condizioni sperimentali, pur sopravvivendo solo una piccola aliquota di elementi cellulari, questi tuttavia presentano un aspetto morfologico perfettamente normale con un metabolismo appena rallentato.

Tali ricerche vanno potenziate utilizzando ceppi cellulari diversi e cercando di ottenere una più approfondita valutazione quantitativa dei dati attraverso la formula cellulare, l'indice mitotico e la conta dei cromosomi.

B) COLTURE CELLULARI PRIMARIE DA CORTECCIA CEREBRALE DI SCIMMIA —
Tecnica delle colture: E' stata perfezionata la tecnica delle colture cellu-

lari ottenute mediante tripsinizzazione, dalla corteccia cerebrale di scimmia, già elaborata negli scorsi anni nel nostro Istituto.

Le cellule vengono ricavate mediante rapida tripsinizzazione a 37°C da un frammento di corteccia cerebrale di scimmia rhesus.

Il terreno di crescita è costituito da:

Siero di scimmia	parti	5
Siero di vitello	»	5
Glutamina (0,5% in H ₂ O distill.)	»	1
Idrolisato di lattalbumina al 5% in Hanks	»	10
Soluzione di Hanks	»	79

Il terreno di mantenimento è il seguente:

Siero di vitello	parti	2
Glutamina 0,5% in H ₂ O distill.	»	1
Soluzione di Earle con 0,5% di idrolisato di lattalbumina	»	97

Morfologia cellulare: Fino all'8^o giorno circa di coltura hanno prevalenza le cellule con un aspetto allungato « di tipo fibroblastico ». A partire dall'8^o giorno le cellule, venendo tra di loro a contatto, assumono una forma grossolanamente poligonale e cominciano a collegarsi mediante delicati prolungamenti fibrillari. Man mano il citoplasma periferico si trasforma in una rete di fibrille che si intersecano in varie direzioni ed in maniera tale da rendere indistinti i limiti tra cellula e cellula; solo una zona limitata di citoplasma perinucleare rimane priva di fibrille ed assume un aspetto granuloso.

L'osservazione delle colture cellulari di cervello di scimmia è stata protratta fino a 70 giorni: questo è stato possibile cambiando ogni 4-6 giorni il terreno nutritivo. Delle cellule sono state mantenute vitali per oltre 100 giorni, impiegando dei terreni di crescita con alto contenuto in siero di vitello (25%) ed ottenendo delle subcolture mediante trattamento con tripsina e versene. Non è stato possibile ancora identificare con sicurezza da quale tipo cellulare della corteccia cerebrale di scimmia derivino gli elementi coltivati.

Infezione con virus umani: Sono stati inoculati in provette di colture cellulari di cervello di scimmia i seguenti virus: poliomielitico tipo 1 Brunhenders, tipo 2 MEF 1, tipo 3 Saukett, tipo 1 LSc-ab-KP-3 pool

(Sabin), tipo 1 WCh-pool 23 (Koprowski); tutti i cinque tipi di Coxsackie B; gli adenovirus tipo 1, 2, 5, 6, 7, 9 (passati in cellule HeLa).

Tutti i tipi ed i ceppi poliomielitici, tutti i Coxsackie B e gli adenovirus di tipo 2, 5, 6, 7 hanno dato degli effetti citopatologici che è stato possibile trasmettere in serie, salvo che per l'adenovirus tipo 6.

Tali colture si vanno ora utilizzando per valutare eventuali differenze di comportamento tra virus poliomielitici e virus Coxsackie B e soprattutto tra i ceppi attenuati ed i ceppi virulenti dei virus poliomielitici.

C) COLTURE CELLULARI SOTTO AGAR. — Nell'anno 1959 è stata perfezionata ed estesamente impiegata la tecnica delle colture sotto agar⁽⁵⁾, secondo il procedimento già descritto lo scorso anno⁽⁶⁾. Le colture usate sono state in assoluta prevalenza quelle primarie di rene di scimmia, fatte sviluppare in matraccini di vetro pirex da 100 cm³. Le colture cellulari sotto agar hanno servito come routine per i seguenti scopi:

1) Titolazione in PFU (plaque forming unit) di sospensioni virali. La riproducibilità dei risultati si è dimostrata notevole.

2) Purificazione di particolari ceppi virali, mediante triplo passaggio in colture sotto agar (polio 1 Brunhilde, polio 2 MEF 1, polio 3 Leon, Coxsackie B 3, ECHO 6).

3) Titolazione del potere antigenico dei vaccini antipoliomielitici inattivati, in base alla loro capacità di legare gli anticorpi (test di Krech).

I vari fattori condizionanti la buona riuscita della tecnica delle colture sotto agar nelle sue applicazioni alla virologia sono stati controllati ed è stata rilevata l'importanza di alcuni di essi, e precisamente:

a) L'importanza delle proteine nel terreno all'agar: con le colture di rene di scimmia si può omettere nel terreno all'agar il siero di cavallo di vitello o di altri animali, purchè vi si aggiungano delle piccole quantità di albumina bovina. Una concentrazione di albumina bovina cristallina inferiore allo 0,05% in assenza di siero comporta un danno più o meno grave delle cellule.

b) L'esposizione alla luce, specie a quella solare, delle colture sotto agar è in grado di danneggiare seriamente o di distruggere le colture cellulari. E' probabile che questa azione della luce sia imputabile ad una azione fotodinamica in presenza di rosso neutro.

c) Impiegando per le colture sotto agar i matraccini di vetro pyrex tappati con tappo di gomma, una piccola quantità di liquido si libera sempre dalla massa di agar stratificata sulle cellule e viene a formare una pellicola liquida tra agar e cellule. Il virus liberato dalle cellule infettate si diffonde in questa falda di liquido con una velocità maggiore e può essere trasportato a una distanza relativamente grande. Questo condiziona da un lato una rapida estensione delle aree di infezione e di lisi cellulare e d'altra parte impedisce di dar valore alle placche che compaiono in caso di virus a ciclo relativamente rapido, quale, ad esempio, i virus poliomielitici, dopo la terza giornata di inoculazione. Questa difficoltà può essere superata tenendo capovolti i matraccini durante l'incubazione di modo che il liquido, liberatosi dall'imbibizione con l'agar, si raccolga nel collo del matraccino.

Placche di lisi cellulare si ottengono anche seminando del virus infettante (ad esempio: virus poliomielitico tipo 3) sopra lo strato di terreno all'agar già condensatosi sulla coltura cellulare: in questo caso le particelle virali si devono diffondere attraverso tutto lo strato di agar prima di raggiungere le cellule ed infettarle. Una tecnica analoga si presenta di possibile applicazione anche per saggiare la presenza di anticorpi in un siero e l'azione antivirale di determinate sostanze: in questo caso potrà essere evidenziata la capacità di un siero o di una determinata sostanza di inibire la distruzione di una coltura infettata con virus (*).

4. - PERFEZIONAMENTO DEI METODI SIEROLOGICI

A) METODO RAPIDO DI TITOLAZIONE DEGLI ANTICORPI NEUTRALIZZANTI CON LETTURA AL MICROSCOPIO. — L'applicazione su vasta scala della vaccinazione contro la poliomielite ha portato alla necessità di un numero sempre più grande di reazioni di neutralizzazione per controllare nel sangue dei vaccinati la presenza o meno di anticorpi per i tre virus polio.

Da questa esigenza ne è conseguita la necessità di semplificare il metodo onde renderlo più accessibile e più rapido.

(*) Sono state ottenute delle colture sotto agar anche di altri ceppi cellulari: si sono registrati discreti risultati col ceppo MS (coltura continua di cellule di rene di scimmia) e con cellule di cervello di scimmia ottenute in coltura primaria mediante tripsinizzazione. In genere si è dimostrato preferibile l'impiego del terreno costituito da soluzione di Eagle in Earle all'agar, invece del terreno di Eagle e lattalbumina. Si è inoltre osservato che per le cellule in coltura continua è necessario includere nel terreno all'agar una maggiore quantità di sostanze proteiche (siero di vitello inattivato, albumina bovina, ecc.).

E' stato pertanto proposto un tipo di reazione che viene allestita in provettine del diametro di mm 15, altezza mm 80 e con il fondo appiattito.

Tali provette sono poste in un portaprovette con fondo a rete, tale da permettere la lettura microscopica dal basso usando un microscopio con sistema ottico al di sotto del piano di osservazione.

Eseguita la diluizione dei sieri, in volume di cm^3 0,40 direttamente in tali provette, si aggiunge nell'ordine, cm^3 0,10 contenente 100 TCID₅₀ di virus, cm^3 0,50 di sospensione cellulare e cm^3 0,40 di olio di vaselina sterile.

La lettura finale si effettua dopo 4-8 giorni a seconda del tipo di virus da titolare.

Questa reazione presenta il vantaggio di poter essere eseguita con la stessa rapidità con cui si allestisce il metodo del colore e dà, però, rispetto a quest'ultimo, risultati precisi che si possono ottenere solo con la lettura al microscopio.

B) ANTICORPI FLUORESCENTI. — Sono state iniziate delle ricerche sul ciclo di sviluppo dei virus ECHO 9 (ceppo Vispo) ⁽⁷⁾ e Cocksackie B 3 in cellule di rene di scimmia, impiegando colture primarie di cellule di rene di scimmia in provette.

Per la fluorescenza è stato eseguito il metodo della stratificazione indiretta secondo la tecnica di WELLER e COONS ⁽⁸⁾. Come sistema intermedio è stato impiegato un siero umano ad alto titolo in anticorpi verso l'ECHO 9. Il siero fluorescente, successivamente, stratificato era costituito da siero coniugato di cavallo antigammaglobuline umane.

I fenomeni rilevati sono i seguenti:

L'antigene specifico compare alla 4^a ora dall'infezione: la fluorescenza ha un aspetto granuloso, pulverulento ed è localizzata attorno al nucleo che presenta un aspetto normale ed è completamente privo di fluorescenza.

Il numero delle cellule fluorescenti aumenta progressivamente dalla 4^a alla 7^a ora (dal 19% al 79% circa) e così l'intensità della colorazione.

L'antigene specifico invade l'intero citoplasma prima sotto forma di granuli e goccioline fluorescenti (fino ad un diametro di 4 micron) e poi costituendo una massa fluorescente relativamente omogenea localizzata attorno o lateralmente al nucleo. A questa massa fluorescente iuxta-nucleare corrisponde, alla controcolorazione con ematossilina-eosina, una vera e propria inclusione eosinofila, di aspetto omogeneo. Il nucleo diventa man mano picnotico e si sposta verso la superficie della cellula senza mai mostrare una fluorescenza specifica.

E' stato altresì saggiato l'impiego della tecnica degli anticorpi fluorescenti:

a) nella titolazione degli anticorpi ECHO 9 ed anti-Coxsackie B3 su un gruppo di sieri umani immuni;

b) nella colorazione di cellule infette, staccate mediante tripsinizzazione dalla provetta di coltura e successivamente strisciate su vetrino e fissate, oppure trattate a fresco;

c) nella evidenziazione di particelle virali al di fuori del substrato cellulare (ECHO 9, virus influenzale tipo A).

I risultati ottenuti non sono ancora dimostrativi.

E' in corso di messa a punto la tecnica di coniugazione dell'isotiocianato di fluorescina con opportuni sieri immuni e la tecnica della colorazione del complemento.

5. - RICERCHE ORIENTATIVE SUL CONTROLLO DEI CHEMIOTERAPICI ANTIVIRALI

Si è iniziata la messa a punto di metodi che permettano di valutare l'attività di farmaci antivirali in vitro, in uova ed in animali da esperimento. Le prove in vitro sono eseguite utilizzando le colture di rene di scimmia ed i virus polio 1, Coxsackie B 1, ECHO 9, vaccino ed adenovirus tipo 7. Gli esperimenti in uova embrionate sono condotti con i virus dell'influenza, herpes simplex e del cimurro.

Per le ricerche in animali da esperimento si usa il topino che viene infettato con influenza PR 8 e con virus dell'epatite, ceppo MHV 3.

Si vanno mettendo a punto metodi che permettano di capire, nel caso di sostanze che presentino una certa attività, se tale attività sia di tipo prevalentemente virulicida o virustatica.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) FELICI A., GINEVRI A. e FRANCO F. - Ann. Inst. Pasteur, 98: 229 (1960).
- (²) FELICI A. e ARCHETTI I. - Boll. Ist. Sieroterap. Ital., in corso di stampa.
- (³) FELICI A., ARCHETTI I., RUSSI F., BELLACCHI C. e MAZZI F. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 695 (1960).
- (⁴) PENSO G. - Fifth International Meeting of Biological Standardization. The Weizmann Science Press of Israel, Jerusalem, 1960.
- (⁵) DULBECCO R. - Proc. nat. Acad. Sci. U. S., 38: 747 (1952).
- (⁶) BALDUCCI D. e coll. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 503 (1960).
- (⁷) ARCHETTI I., FELICI A., RUSSI F. e FUA' C. - Sc. med. ital., 5: 324 (1956).
- (⁸) WELLER T. H. e COONS A. H. - Proc. Soc. exp. Med., 98: 249 (1958).