

12. A. FELICI e I. ARCHETTI. — Ricerche etiologiche su alcuni focolai di meningite asettica nell'Italia centro-settentrionale.

Riassunto. — Nel corso di due focolai epidemici di una forma di meningite benigna, verificatisi nell'estate 1955, il primo in provincia di Forlì ed il secondo in provincia di Venezia, è stata dimostrata l'importanza etiologica di un ceppo di virus coxsackie del gruppo A antigenicamente simile al ceppo isolato precedentemente dagli AA. in provincia di Ancona.

Dall'insieme di 37 malati sono stati isolati 10 ceppi del virus dei quali 4 dalle feci, 4 da liquor e due dal gargarizzato.

Il ruolo etiologico di tale virus è stato confermato dai tests serologici con la dimostrazione di un salto nel tasso degli anticorpi nel siero convalescente degli individui studiati.

Résumé. — En été 1955 se vérifièrent deux foyers épidémiques de méningite bénigne, l'un dans la province de Forlì et l'autre dans la province de Venise. A cette occasion on a pu démontrer l'importance étiologique d'une souche de virus coxsackie du groupe A, antigéniquement similaire à la souche précédemment isolée par les auteurs dans la province d'Ancone.

Sur un total de 37 malades on a isolé 10 souches de virus: 4 dans les selles, 4 dans le liquor et deux dans la solution utilisée pour les gargarismes.

Le rôle étiologique de ce virus a été confirmé par les tests sérologiques qui ont mis en évidence une différence remarquable dans le taux des anticorps présents dans le sérum pendant la convalescence des individus étudiés.

Summary. — In the course of two epidemic outbreaks of a benign form of meningitis which occurred in the summer of 1955, the first in the province of Forlì and the second in the province of Venezia, the etiological importance was shown of a strain of coxsackie virus of group A, antigenically similar to the strain previously isolated by the authors in the province of Ancona.

From a total of 37 patients, 10 strains of the virus were isolated, 4 from the faeces, 4 from the cerebrospinal fluid and 2 from throat swabs.

The etiological role of the virus has been confirmed from serological tests with demonstration of a rise in the antibody level, in the serum of the individuals studied, during convalescence.

Zusammenfassung. — In zwei epidemischen Herden gutartiger Meningitis die im Sommer 1955 in der Provinz Forlì bzw. Provinz Venezia zum Ausbruch kamen, wurde die ätiologische Bedeutung eines der Gruppe A angehörenden Coxsackievirus erwiesen; dieser Virus war antigenisch dem Stamme den die Verfasser bereits in Provinz Ancona isoliert hatten, ähnlich.

Aus 37 Kranken wurden insgesamt 10 Virusstämme isoliert und zwar: 4 aus den Fäces, 4 aus dem Liquor und 2 der Rachenspülung.

Die Rolle dieses Virus wurde durch die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen und durch den Sprung des Antikörpergehalts im Serum der Genesenden bewiesen.

INTRODUZIONE

Nell'estate del 1955 si sono verificati in Italia, vari episodi epidemici di una forma di meningo-encefalite asettica, che ha avuto il suo massimo sviluppo nella regione marchigiana e che è stata denunciata da varie comunicazioni scientifiche (1, 2, 3, 4, 5).

Nel corso di tali episodi, sono state condotte indagini, dirette alla identificazione dell'eventuale agente etiologico, le quali hanno individuato quali responsabili della forma morbosa, virus del gruppo Coxsackie (6, 7, 8, 9).

Nella zona di Ancona è stato isolato, quale causa della malattia, un virus coxsackie del gruppo A non classificabile tra i 19 ceppi, costituenti tale gruppo, sinora noti (7).

Nel corso di tali episodi epidemici, noi abbiamo avuto, tra l'altro, la possibilità di studiare due successivi focolai, il primo verificatosi nel luglio-agosto, nella provincia di Forlì ed il secondo nel settembre in provincia di Venezia.

Il presente lavoro comprende i risultati microbiologici ottenuti nel corso di tali ricerche.

MATERIALI E METODI

RACCOLTA DEL MATERIALE

Il materiale di studio era costituito da campioni di feci, campioni di liquami di fogna, campioni di liquor, e di gargarizzato e campioni di siero prelevati sia in fase acuta che in fase di convalescenza.

Tale materiale, esclusi i sieri, perveniva al nostro laboratorio congelato in cassette termostatiche entro il minor tempo possibile.

Complessivamente sono stati così inviati dall'Ospedale Civile di S. Donà di Piave: 10 campioni di feci, 2 campioni di liquor e 6 doppi campioni di siero.

Dal Laboratorio di Igiene e Profilassi di Forlì abbiamo ricevuto: 55 campioni di feci, dei quali solo 13 appartenenti a malati o a convalescenti, 45 campioni di gargarizzato, di cui solo 4 appartenenti a malati, 8 campioni di liquor, 5 campioni di liquami di fogna e 6 doppi campioni di siero.

Per l'allestimento del materiale sono state seguite le tecniche abituali.

Culture di tessuto ed inoculazione nei topini lattanti.

Sono state impiegate culture in vitro di cellule renali di scimmia (*Macacus Rhesus* o *Cynomolgus*) preparate mediante tripsinizzazione secondo la tecnica di DULBECCO e VOGT modificata da YOUNGNER ⁽¹⁰⁾. Come liquido nutritivo e di mantenimento venne usato quello di KRET ⁽¹¹⁾, lievemente modificato.

Per l'inoculazione in topini lattanti sono state usate sempre covate di uno o due giorni. Per l'inoculazione si è seguita la via intraperitoneale o sottocutanea adoperando il liquido di cultura al primo passaggio nella qualità di 0,04 cm³.

I topini venivano seguiti per due settimane.

TESTS DI NEUTRALIZZAZIONE E DI DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO.

La prova di neutralizzazione è stata applicata come « screening test » per l'identificazione dei vari ceppi isolati, usando come antisiero standard un siero da noi preparato secondo la tecnica di BEEMAN et Al. ⁽¹²⁾ usando come antigene il virus da noi isolato durante l'epidemia marchigiana ⁽⁷⁾. Per lo screening l'immunsiero ad alto titolo neutralizzante veniva diluito 1:10 cimentandolo con una diluizione approssimativa di 10⁻² del liquido di cultura del passaggio di isolamento.

La prova di deviazione del complemento venne eseguita usando il micrometodo su piastra secondo FULTON e DUMBELL ⁽¹³⁾. Per la preparazione dell'antigene e l'esecuzione della prova si è seguito il metodo da noi già usato in altro lavoro ⁽¹⁴⁾.

RICERCHE ETIOLOGICHE

Sono stati studiati complessivamente 125 campioni di materiale appartenente a 92 individui, materiale così distribuito: 65 campioni di feci, 10 campioni di liquor, 45 campioni di gargarizzato, 5 campioni di liquame di fogna.

Dall'insieme di questo materiale, sono stati isolati 10 ceppi di un agente citopatogeno di cui: 4 dalle feci, 3 dal liquor, 2 dal gargarizzato.

I risultati ottenuti all'isolamento sono riassunti nella tabella A.

TABELLA A

S. Donà di Piave

	N° casi	Malati	Familiari	Positivi	Negativi
Feci	10	10	—	2	8
Liquor	2	2	—	1	1
Gargarizzato	—	—	—	—	—
Liquame di fogna	—	—	—	—	—

Cesena

Feci	55	13	42	2	53
Liquor	8	8	—	3	5
Gargarizzato	45	4	41	2	43
Liquame di fogna	5	—	—	—	5

Nei casi di Cesena la positività, sia dalle feci che dal gargarizzato si è ottenuta solo in malati, ad eccezione di un caso, in cui l'isolamento dalle feci si è ottenuto in un familiare.

In un solo caso abbiamo ottenuto l'isolamento contemporaneo dal liquor e dalle feci. Per tutti i ceppi isolati è stato praticato il test di neutralizzazione con gli immunsieri antipoliomielitici, con risultati negativi.

Con tre, degli agenti citopatogeni, isolati rispettivamente dalle feci, dal liquor e dal gargarizzato è stata tentata l'inoculazione in covate di topini lattanti.

Verso il quarto giorno di osservazione si rendeva evidente una paralisi flaccida che precedeva di qualche giorno la morte dei topini.

Le caratteristiche del reperto istologico confortavano notevolmente l'appartenenza dei ceppi studiati al gruppo A dei virus Coxsackie.

Per l'individuazione di tipo sono state eseguite prove di neutralizzazione con immunsieri standard da noi preparati con il ceppo di virus Cocksackie da noi isolato durante l'epidemia marchigiana.

In base ai risultati di tali prove è stata provata la stretta affinità antigenica tra i ceppi da noi isolati dai casi di S. Donà e di Cesena ed il virus responsabile della epidemia marchigiana, che come è stato precedentemente comunicato è un virus coxsackie di tipo A non appartenente a nessuno dei 19 ceppi di tale gruppo sinora noti (7).

DATI SEROLOGICI

Per quanto l'importanza etiologica del virus da noi isolato fosse stabilita con certezza dal semplice isolamento del virus stesso oltre che dal gargarizzato e dalle feci anche dal liquor, quale espressione indubbia di una infezione, da parte del virus del sistema nervoso centrale, si è egualmente proceduto ad un accertamento serologico nel siero acuto e convalescente di tali malati, allo scopo di stabilire, anche serologicamente la importanza causale del virus isolato.

Sono stati così analizzati con il test di deviazione del complemento, usando come antigeni standard, il virus isolato ad Ancona, 12 paia di sieri, 6 provenienti dai casi di S. Donà e 6 dai casi di Cesena.

Nella metà di essi è stato messo in evidenza un salto od una ascesa da $< 1:4$ del tasso degli anticorpi. Tab. B.

TABELLA B

6971	$< 1:4$	6975	$< 1:4$	3°	1:8
6971bis	1:16	6975bis	1:16	3°bis	1:8
6972	1:8	6974	$< 1:4$	4°	$< 1:4$
6972bis	1:8	6974bis	1:8	4°bis	1:16
6977	1:16	1°	$< 1:4$	5°	1:8
6977bis	1:16	1°bis	1:16	5°bis	1:8
6973	1:8	2°	1:4	6°	1:16
6973bis	1:16	3°	1:4	6°bis	1:16

La prova di deviazione del complemento fu eseguita nel mese di dicembre dopo che i sieri studiati erano stati mantenuti per circa quattro mesi a $+4^{\circ}\text{C}$.

DATI EPIDEMIOLOGICI

I casi da noi studiati in provincia di Venezia provenivano dall'Ospedale Civile di S. Donà; primario prof. A. DE GIORGIO.

I casi provenienti dalla provincia di Forlì ci sono stati inviati dal reparto medico-micrografico del Laboratorio Provinciale di Igiene e Profilassi diretto dal Dott. M. CONTI e provenivano da varie località della provincia.

In provincia di Forlì i casi si sono verificati con maggiore frequenza nel Cesenate e prevalentemente dalle seguenti località: S. Carlo e Monteleone, comune di Roncofreddo, ambedue in prossimità di Cesena, situate S. Carlo in collina e Monteleone in montagna.

Le famiglie esaminate e colpite da meningite sono isolate dal centro abitato.

Si tratta di famiglie numerose (10-13 componenti) costituite da contadini, con servizi igienici insufficienti o addirittura inesistenti come nella frazione di Monteleone.

In questi centri si sono verificati circa 30 casi di meningite: colpiti prevalentemente soggetti di giovane età, bambini e raramente adulti (*).

Dall'insieme dei dati presentati risulta chiaro come, nell'estate 1955, accanto al focolaio centrale dell'epidemia marchigiana di meningite benigna rappresentato dalla città di Ancona e dai casi verificatisi nella provincia di Pesaro, pure nelle province, romagnola e veneta si sono avuti numerosi casi di una sindrome clinica analoga, anche questi causati da un virus del gruppo coxsackie.

I dati di laboratorio ottenuti nei casi descritti convalidano per la provincia di Forlì e di Venezia l'identità sierologica del ceppo di virus isolato con il ceppo precedentemente isolato nella provincia di Ancona.

Nel periodo che ha preceduto la pubblicazione del presente lavoro, è stata notata sia da parte nostra che da parte di altri, sia in Italia che all'estero, l'affinità antigenica del ceppo da noi isolato con il virus ECHO tipo 9.

Il problema della nomenclatura da usare, ancora dibattuto, ha scarso significato pratico; maggiore interesse, ha per noi, la eventualità di una attualmente ipotetica ecologia comune fra le due famiglie di virus enterici citate e possibilmente tra queste e la famiglia dei virus poliomielitici.

(*) I dati epidemiologici riferiti riguardanti la zona di Cesena ci sono stati forniti dal Dott. Conti M. Direttore della sezione medico-micrografica del Laboratorio Provinciale di Igiene e Profilassi di Forlì.

Esprimiamo il nostro ringraziamento, per aver collaborato alla segnalazione degli episodi epidemici ed alla raccolta del materiale, al Dott. Conti M. direttore della sezione medico-micrografica del Laboratorio di Igiene e Profilassi di Forlì; al direttore della sezione medico-micrografica del Laboratorio Provinciale di Igiene e Profilassi di Venezia, Prof. Canalis A.; al Prof. De Giorgio A. Primario medico dello Ospedale Civile di S. Donà.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) RUSSI F.: « Ondata epidemica stagionale dell'infezione neurotrofa endemo-epidemica marchigiana con 200 casi di meningite linfocitaria benigna ospedalizzati in Ancona nel luglio-agosto 1955 ». - Atti 56° Congr. Soc. Ital. Med. interna, 3-5 ottobre 1955, Pozzi Editore Roma.
- (²) NARDI F.: « Medico condotto ». - 10: 667 (1955).
- (³) CUPPINI R.: Discussione alla relazione di Condorelli: « Sulle neurassiti primarie endemiche in Italia di natura presumibilmente virale ». - Atti del 56° Congr. Soc. Ital. Med. Interna Roma 3-5 ott. 1955, Pozzi Editore Roma.
- (⁴) CUPPINI R., CARNEVALI S., CAROTTI A.: « Aggiornamenti malattie da Infezione ». - 1: 21 (1956).
- (⁵) DORIA: « Discussione alla relazione di Condorelli sulle neurassiti primarie endemiche in Italia di natura presumibilmente virale ». - Atti del 56° Congr. Soc. Ital. Med. Interna Roma, 3-5 ottobre 1955, Pozzi Editore Roma.
- (⁶) ARCHETTI I., FELICI A., MIGLIORI V., RUSSI F. - Rendic. Accad. Naz. dei Lincei, 3-4 (1955).
- (⁷) ARCHETTI I. FELICI A. - Rendic. Accad. Naz. dei Lincei, 3-4 (1955).
- (⁸) ARCHETTI I., FELICI A. - Riv. Ist. Sieroterapico Ital., 3: 263 (1956).
- (⁹) RITA G., RUSSI M., FISCHER-FANTUZZI L. - Riv. Ist. Sieroterapico Ital., 3: 266 (1956).
- (¹⁰) YOUNGNER J. S. - Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 85: 202 (1954).
- (¹¹) KRET A. - Arch. für die Gesamte Virusforschung, 6: 60 (1955).
- (¹²) BEEMAN E. A., HUERNER R. J. e CALE R. M. - American Journal of Hygiene, 55: 83 (1952).
- (¹³) FULTON F., DUMBELL K. R. - J. Gen. Microbiology, 3: 99 (1943).
- (¹⁴) ARCHETTI I., FELICI A., RUSSI F., FUÀ C. - Scientia Medica Italica, 5: 317 (1956).