

18. L. RAVAIOLI, Z. ORFEI, A. D'AMORE, V. MAZZARACCHIO e B. CASTAGNOLI.
— Il virus aftoso su coltura di tessuti "in vitro". - III. Neutralizzazione con sieri immuni "in vitro" ed attività deviante il complemento dei virus A₄, O, C nelle diverse ore di sviluppo (*).

Riassunto. — Vengono eseguite ricerche con esito positivo sull'attività neutralizzante « in vitro » (cellule renali tripsinizzate di suino) dei sieri immuni antiaftosi A₄, O, C.

Inoltre viene saggiata l'attività deviante il complemento, su piastre di perspex, dei virus-antigeni aftosi, coltivati « in vitro », nelle diverse ore di sviluppo.

Anche questa ricerca ha avuto esito positivo nel senso che per tutti e tre i tipi di virus si è avuta la massima attività deviante dalla 18^a alla 30^a ora di sviluppo.

Résumé. — On effectue des recherches, sortant un résultat positif, à propos de l'activité neutralisante « in vitro » (cellules rénales tripsinisées de porc) des sérums immunisés anti-aphteux A₄, O, C.

On contrôle aussi, sur des plaques de perspex, l'activité déviant le complément des virus-antigènes aphteux, cultivés « in vitro » au cours des différentes heures de développement.

Cette recherche aussi a donné un résultat positif dans le sens que pour tous les trois types de virus on a eu l'activité déviante maxima de la 18^{ème} à la 30^{ème} heure du développement.

Summary. — Researches have been followed on the neutralizing activities « in vitro » (trypsinized renal cells of swine) of the anti foot and mouth disease sera A₄, O, C.

The complement fixation activities of the foot and mouth disease virus antigens cultivated « in vitro », and assayed on Perspex plates at different development times, have also been determined.

For all three types of virus used the maximum complement fixation activity was found to be present at from 18 to 30 hours of development.

Zusammenfassung. — Es wurden Versuche ausgeführt mit dem positiven Ergebnis der neutralisierenden Aktivität « in vitro » (Nierenzellen, behandelt mit Trypsin, des Schweines), der gegen die Maul- und Klauenseuche immunen Serum A₄, O, C.

Ausserdem wurde die Aktivitätskomplementablenkung auf Perspex-

(*) Lavoro presentato all'XI Convegno della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, (Rimini, 12-15 settembre 1957).

Platten geprüft, die Antigen-Viren der Maul- und Klauenseuche kultiviert « in vitro », in den verschiedenen Stunden der Entwicklung.

Auch dieser Versuch hatte ein positives Ergebnis, in diesem Sinne, als man für alle drei Virustypen die höchste Aktivitätsablenkung von der 18. bis zur 30. Stunde der Entwicklung hatte

In precedenti note (¹⁻²) abbiamo studiato la possibilità di coltivare il virus aftoso « in vitro » e ne abbiamo determinato la curva di crescita.

La presente nota, proseguendo lo studio delle attività biologiche dei virus aftosi coltivati « in vitro », ha un duplice scopo: determinare le possibilità di attuare una reazione di neutralizzazione « in vitro » e controllare se i virus aftosi, sempre coltivati in vitro e prelevati a diverse ore di sviluppo, possano fornire un antigene capace di fissare il complemento.

Materiale e metodo per la neutralizzazione. - La neutralizzazione con siero immune è stata eseguita « in vitro » su colture di cellule tripsinizzate di rene suino preparate secondo la usuale tecnica (³). I virus usati sono stati i tipi A₄, O, C, coltivati su cellule renali di suino. I sieri immuni sono stati ottenuti da cavie immunizzate con virus (epitelio podale di cavia) secondo la tecnica di UBERTINI (⁴) e tali sieri non sono stati inattivati. Le varie diluizioni del siero da titolare sono state mescolate con uguali quantità di virus diluito in modo che in 0,1 cm³ fossero contenute circa 100 dosi citopatogene (DCPT₅₀). La miscela siero-virus è stata tenuta a temperatura ambiente (22°C. circa) per un'ora e quindi inoculata in 4 tubi per ogni diluizione nella quantità di 0,2 cm³ per tubo. Le letture dei risultati sono state eseguite dopo 2-3-4 giorni dalla inoculazione ed il titolo limite di neutralizzazione del siero è stato calcolato secondo il metodo di REED e MUENCH (⁵).

Materiale e metodo per la deviazione del complemento. - La deviazione del complemento è stata eseguita su piastre di perspex secondo la tecnica di FULTON e DUMBELL (⁶) modificata da MORGAN e collaboratori (⁷). L'antigene è costituito da virus-cultura di 3-6-10-14-18-22-26-30-48 ore tenuto a 56°C. per 30'. Il siero immune, ottenuto da cavie inoculate secondo la tecnica di UBERTINI (⁴), viene inattivato a 56°C. per 30'.

Il complemento, siero di cavia maschio, è titolato in presenza sia dell'antigene che del siero immune. La più alta diluizione del complemento

che dà emolisi completa è considerata una unità di complemento. Nella reazione si usano almeno due unità di complemento. Il siero immune viene diluito serialmente da 1:2 fino alla dose di 1:512, in ragione 2, mentre l'antigene viene diluito serialmente da 1:2 a 1:128. Antigene, antisiero e tutti gli altri reagenti vengono diluiti con soluzione tampone al veronal secondo le indicazioni di MAYER e collaboratori (8).

Una goccia di tali diluizioni viene posta sulla piastra in senso verticale per l'antigene ed in senso orizzontale per l'antisiero. A queste due gocce se ne aggiunge quindi una terza contenente due unità di complemento. Dopo 24 ore di ghiacciaia a 4°C. si aggiunge una goccia di sistema emolitico formato da parti uguali di una sospensione di emazie di montone all'1% e di emolisina Wellcome a titolo 1:2000 diluita 1:200 (pari a 5 unità emolitiche) e dopo altre 2 ore di permanenza a 37°C. in termostato, si legge la reazione.

La lettura viene fatta indicando la completa emolisi con 0 e la minore o maggiore assenza di emolisi con i numeri 1, 2, 3, 4. La più alta diluizione dell'antigene e dell'antisiero che ha dato una reazione indicata con il numero 2 (pari a circa il 50% di emolisi), viene considerata come titolo finale. Con tale tecnica è possibile, usando una relativamente piccola quantità di materiale, osservare la reazione su di una assai ampia scala di valori sia dell'antigene che dell'anticorpo.

RISULTATI DELLA SIERO NEUTRALIZZAZIONE.

TAVOLA 1

Neutralizzazione dei sieri immuni anti A₁, O, C.

Virus (*)	Siero anti A ₁ (**)	Siero anti O (**)	Siero anti C (**)	Siero normale
A	128	—	—	—
O	—	256	—	—
C	8	—	182	—

(*) sono state usate 100 DCTP₅₀.

(**) Il titolo è espresso con il valore reciproco della diluizione finale del siero.

I risultati delle nostre esperienze possono venire brevemente riassunti dalla tavola n. 1. Da essa è evidente che l'attività neutralizzante dei sieri è specifica raggiungendo titoli di 1:128, 1:256, 1:182 rispettivamente per i virus A₁, O e C. Solo il siero anti A₁ ha dimostrato una scarsa attività di gruppo neutralizzando fino a titolo 1:8 il virus C.

TAVOLA 2

Attività deviante il complemento dell'antigene tipo A₄ alla 18^o ora.

Diluizioni del siero	Diluizioni dell'antigene							Controllo siero
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
1:2	4	4	4	4	2	1	0	0
1:4	4	4	2	1	0	0	0	0
1:8	4	2	0	0	0	0	0	0
1:16	2	0	0	0	0	0	0	0
1:32	2	0	0	0	0	0	0	0
1:64	2	0	0	0	0	0	0	0
1:128	1	0	0	0	0	0	0	0
1:256	0	0	0	0	0	0	0	0
1:512	0	0	0	0	0	0	0	0
Controllo antigene	0	0	0	0	0	0	0	0

Unità complemento 2
Controllo sistema emolitico 0

Controllo emazie 4

TAVOLA 3

Deviazione del complemento del virus A₄.

Ore di sviluppo	Titolo dello antigene (*)	Titolo del siero (*)	Reazioni eterotipiche	
			siero A ₄ virus O	siero A ₄ virus C
3	0	0	Negativo	Positivo 1/2
6	0	0		
10	0	0		
14	4	64		
18	32	64		
22	32	16		
26	16	32		
30	4	32		
48	4	16		

(*) Valore reciproco delle diluizioni

TAVOLA 4

Deviazione del complemento del virus tipo O.

Ore di sviluppo	Titolo dello antigene (*)	Titolo del siero (*)	Reazioni eterotipiche	
			siero O virus A ₁	siero O virus C
3	0	0	Positivo 1/4	Positivo 1/4
6	0	0		
10	4	8		
14	16	16		
18	32	16		
22	32	16		
26	32	16		
30	16	16		
48	8	16		

(*) Valore reciproco delle diluizioni

TAVOLA 5

Deviazione del complemento del virus tipo C.

Ore di sviluppo	Titolo dello antigene (*)	Titolo del siero (*)	Reazioni eterotipiche	
			siero C virus O	siero C virus A ₁
3	0	0	Negativo	Positivo 1/2
6	0	0		
10	4	2		
14	4	8		
18	4	16		
22	8	32		
26	8	4		
30	8	4		
48	4	4		

(*) Valore reciproco delle diluizioni

RISULTATI DELLA DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO.

Un esempio di deviazione del complemento è dato dalla tavola n. 2 che rappresenta l'attività deviante del siero nei riguardi dell'antigene tipo A_4 nella 18^a ora di sviluppo. In base a questi dati il titolo dell'antigene viene considerato uguale ad 1:32 e quello dell'antisiero uguale ad 1:64 in rapporto rispettivamente al siero ed all'antigene diluiti 1:2.

Nelle tavole n. 3, 4, 5 sono riportati i dati delle deviazioni del complemento eseguite nelle diverse ore di sviluppo del virus-antigene rispettivamente di tipo A_4 , O e C. Da tali esperienze è evidente che i titoli più alti devianti il complemento corrispondono alle ore di sviluppo 18^a e 22^a per il virus A_4 (1:32), alle ore 18^a, 22^a e 26^a per il virus O (1:32) ed alle ore 22^a, 26^a e 30^a per il virus C (1:8).

CONCLUSIONI

Le conclusioni che possono trarsi dal presente lavoro sono:

- 1) la neutralizzazione « in vitro » permette di titolare esattamente l'attività di un siero immune;
- 2) l'attività deviante il complemento dei virus aftosi coltivati « in vitro » raggiunge il suo massimo valore alla 18^a, alla 22^a, alla 26^a ed alla 30^a ora di sviluppo;
- 3) entrambe le reazioni risultano nettamente tipo specifiche.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) MAZZARACCHIO V., ORFEI Z., D'AMORE A., RAVAIOLI L., CASTAGNOLI B. - Zooprofilassi, 11: 277 (1936).
 - (²) MAZZARACCHIO V., D'AMORE A., ORFEI Z., RAVAIOLI L., CASTAGNOLI B. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 20: 514 (1937).
 - (³) YOUNGNER J. S. - Proc. Soc. Exp. Biol., 85: 202 (1954).
 - (⁴) UBERTINI B. - Zooprofilassi, 2: 324 (1947).
 - (⁵) REED L. J., MÜENCH H. - Am. J. Hyg., 27: 493 (1938).
 - (⁶) FULTON F., DUMBELL K. R. - J. Gen. Microb., 3: 97 (1949).
 - (⁷) MORGAN P., CARTER J. S., WENNER H. A. - J. Lab. Clin. Med., 42: 655 (1953).
 - (⁸) MAYER M. M., OSLER A. G., BIER O. G., HEIDELBERGER M. - J. Exp. Med., 84: 535 (1946).
-