

20. Z. ORFEI, L. RAVAIOLI, A. D'AMORE, V. MAZZARACCHIO e B. CASTAGNOLI. —  
Il virus aftoso su coltura di tessuti "in vitro". V. Inibizione  
tra i virus aftosi attivi tipo O e tipo A<sub>4</sub> (\*).

**Riassunto.** — Viene saggiata « in vitro », su cellule renali tripsinizzate di suino, l'attività inibente del virus aftoso tipo O nei riguardi del virus aftoso tipo A<sub>4</sub>. Tale attività si è dimostrata parzialmente presente quando il virus in competizione viene inoculato 4 ore dopo il primo virus; il fenomeno si manifesta con più evidenza quando il virus in competizione viene insemenato 8 ore dopo il virus inibente.

**Résumé.** — On expérimente « in vitro », sur des cellules rénales tripsinisées de porc, l'activité inhibente du virus aphteux du type O par rapport au virus aphteux du type A<sub>4</sub>. Cette activité a paru partiellement lorsque le virus en compétition est inoculé 4 heures après le premier virus; le phénomène s'est manifesté plus clairement lorsque le virus en compétition est insémené 8 heures après le virus inhibent.

**Summary.** — The inhibiting activity of foot-and-mouth disease virus type O against type A<sub>4</sub> one has been tested in vitro on trypsinized kidney cells of swine. Such activity proved to be partially present when the competing virus was inoculated 4 hours after the first virus. This phenomenon appeared more evident when the competing virus was seeded 8 hours after the inhibiting one.

**Zusammenfassung.** — Es wurde « in vitro », auf Nierenzellen, behandelt mit Trypsin, des Schweines, die verbietende Aktivität des Virus der Maul- und Klauenseuche Typ O gegenüber dem Virus der Maul- und Klauenseuche Typ A<sub>4</sub> ausgeführt. Diese Aktivität hat sich teils anwesend gezeigt als der Konkurrenzvirus 4 Stunden nach dem ersten Virus eingepflicht wurde; das Phänomen zeigte sich mit grösserer Klarheit, als wenn der Konkurrenzvirus 8 Stunden nach dem verbietenden Virus eingepflicht wurde.

---

In un precedente lavoro <sup>(1)</sup>, abbiamo osservato come il virus aftoso tipo A<sub>4</sub>, inattivato sia con il calore che con la formaldeide, non dimostri alcuna attività interferente nei riguardi del virus omologo attivo.

---

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

Col presente lavoro abbiamo voluto indagare se il virus aftoso attivo tipo O, inibisca lo sviluppo del virus aftoso eterotipico attivo tipo A<sub>4</sub>.

Col termine interferenza si suole indicare quel fenomeno per cui un virus che ha infettato una cellula, previene o impedisce, anche solo parzialmente, la contemporanea moltiplicazione di un altro virus nella stessa cellula. Questo quindi implica necessariamente la sopravvivenza della cellula all'azione del primo virus. Nel caso invece nel quale la cellula possa venire distrutta dal primo virus, il termine interferenza non è più esatto dato che il secondo virus si trova nella impossibilità di sviluppare su di una cellula che già si trova in un iniziale stato di alterazione od in una totale degenerazione per l'azione del primo virus.

E' questo il motivo per cui nel presente lavoro, noi abbiamo parlato d'inibizione e non di interferenza.

#### MATERIALE E METODO.

*Virus.* — Sono stati usati i tipi O ed A<sub>4</sub> di virus aftoso rispettivamente al 25° ed al 26° passaggio su colture di cellule renali tripsinizzate di suino con titolo citopatogeno (DCPT<sub>50</sub>) di 10<sup>-5,23</sup> e di 10<sup>-5,50</sup>/0,1 cm<sup>3</sup>.

*Siero immune.* — Sieri immuni di cavia ottenuti secondo la tecnica di UBERTINI (2) ed aventi un titolo neutralizzante di 1:256 per 100 DCPT<sub>50</sub> per l'O e di 1:512 per 100 DCPT<sub>50</sub> per l'A<sub>4</sub>.

*Culture di tessuti.* — Cellule renali tripsinizzate di suino secondo la tecnica già descritta (3).

*Schema dell'esperimento.* — I tubi coltura vengono inoculati con una determinata dose di un tipo di virus e dopo un certo numero di ore d'incubazione lavati, allo scopo di eliminare il virus del primo inoculum non adsorbito alle cellule, e di nuovo insemenzati con un'altra determinata dose di virus eterotipico.

L'interpretazione dei risultati si basa sulla possibilità di dimostrare che il virus, inoculato per primo, impedisca o meno lo sviluppo del virus inoculato per secondo. A tale scopo vengono eseguite prove di neutralizzazione con gli antisieri specifici ed un numero di controlli vari è incluso nel test come è descritto nella esecuzione della prova.

*Esecuzione della prova.* — Con 20.000 DCPT<sub>50</sub> (cm<sup>3</sup> 0,2) di virus aftoso tipo O si inoculano 4 tubi coltura, dopo 4 ore si lavano con 5 cm<sup>3</sup> di terreno di mantenimento (3) per tre volte e quindi si inoculano di nuovo con 1.000 DCPT<sub>50</sub> (cm<sup>3</sup> 0,1) di virus aftoso tipo A<sub>4</sub>.

Con uguale procedimento viene eseguita una seconda prova nella quale i tubi-coltura vengono lavati ed insemenzati con il secondo virus dopo 8 ore d'incubazione.

Contemporaneamente 8 tubi-coltura, usati come controllo, vengono insemenzati con le stesse dosi rispettivamente 4 con il solo tipo 0 e 4 con il solo tipo  $A_4$ . Dopo 20 ore dalla seconda inoculazione il liquido dei tubi-coltura viene raccolto in pools distinti. L'esistenza o meno del fenomeno d'inibizione del tipo 0 sull' $A_4$  viene stabilito titolando il pool in presenza di antisieri specifici. A tale scopo  $0,5 \text{ cm}^3$  di liquido dei pools (in toto ed a diluizioni di 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024) sono addizionati ad uguali volumi degli antisieri diluiti 1:2. La miscela è mantenuta per un'ora a temperatura ambiente e quindi inoculata nella quantità di  $\text{cm}^3 0,2$  in 4 tubi-coltura per ogni diluizione.

Le prove di neutralizzazione fatte sono costituite da:

- 1) titolazione del liquido colturale proveniente dai pools infettati sia con virus 0 che con virus  $A_4$  in presenza degli antisieri 0 ed  $A_4$ ;
- 2) titolazione del liquido colturale del pool infettato con il solo virus 0 in presenza di siero anti 0 ed anti  $A_4$ ;
- 3) titolazione dello stesso liquido colturale in presenza di siero normale di cavia;
- 4) titolazione del liquido colturale del pool infettato con solo virus  $A_4$  in presenza di siero anti 0 ed anti  $A_4$ ;
- 5) titolazione dello stesso liquido colturale in presenza di siero normale di cavia.

**RISULTATI E CONCLUSIONI.** — Le nostre prove si sono limitate ad inoculare il virus in competizione ( $A_4$ ) solo dopo 4 ed 8 ore poichè oltre tale ora il primo virus inoculato (0) dimostrava già una iniziale azione citopatogena.

La neutralizzazione dei virus tipo 0 ed  $A_4$ , nei riguardi dei rispettivi sieri, è risultata nettamente specifica confermando i risultati ottenuti in un precedente lavoro (4).

La neutralizzazione con siero di cavia normale del pool contenente solo il virus tipo 0 è risultata nettamente negativa (totale azione citopatogena).

La neutralizzazione con siero anti 0 del pool contenente solo virus tipo 0 è risultata totalmente positiva (totale assenza di azione citopatogena).

La neutralizzazione con siero anti  $A_4$  del pool contenente solo virus tipo O è risultata nettamente negativa (totale azione citopatogena).

Risultati analoghi si sono ottenuti dalle neutralizzazioni con siero di cavia normale, con siero anti O e con siero anti  $A_4$  nei riguardi del pool contenente il solo virus tipo  $A_4$ .

Questi controlli sono stati fatti per i pools nei quali il secondo virus

Attività inibente del virus aftoso tipo O verso il virus aftoso tipo  $A_4$ .

| Inoculazione Virus                                           |                                                            | Titolazione<br>con siero<br>(dil. 1:2)   | Effetto citopatogeno (**)     |     |      |      |       |        | Risultati              |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|-----|------|------|-------|--------|------------------------|
| Prima<br>inoculazione<br>20.000<br>DCPT <sub>50</sub><br>(*) | Seconda<br>inoculazione<br>1.000 DCPT <sub>50</sub><br>(*) |                                          | diluizioni iniziali del virus |     |      |      |       |        |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | in toto                       | 1:4 | 1:16 | 1:64 | 1:256 | 1:1024 |                        |
| tipo 0                                                       | —                                                          | normale<br>anti—O<br>anti—A <sub>4</sub> | +                             | +   | +    | +    | +     | +      | Inibizione<br>parziale |
|                                                              |                                                            |                                          | —                             | —   | —    | —    | —     | —      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
| tipo 0                                                       | tipo A <sub>4</sub>                                        | anti—O<br>anti—A <sub>4</sub>            | +                             | +   | +    | —    | —     | —      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
| —                                                            | tipo A <sub>4</sub>                                        | normale<br>anti—O<br>anti—A <sub>4</sub> | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | —                             | —   | —    | —    | —     | —      |                        |
| tipo 0                                                       | —                                                          | normale<br>anti—O<br>anti—A <sub>4</sub> | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | —                             | —   | —    | —    | —     | —      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
| tipo 0                                                       | tipo A <sub>4</sub>                                        | anti—O<br>anti—A <sub>4</sub>            | +                             | +   | —    | —    | —     | —      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
| —                                                            | tipo A <sub>4</sub>                                        | normale<br>anti—O<br>anti—A <sub>4</sub> | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | +                             | +   | +    | +    | +     | +      |                        |
|                                                              |                                                            |                                          | —                             | —   | —    | —    | —     | —      |                        |

(\*) Dose citopatogena 50.

(\*\*) Presenza od assenza dell'effetto citopatogeno indicato con i segni + e —.

(tipo  $A_4$ ) è stato inoculato sia in 4<sup>a</sup> che in 8<sup>a</sup> ora dal primo inoculum (tipo O).

Il test di inibizione del pool contenente sia il virus O che  $A_4$ , inoculato dopo 4 ore, ha dato i seguenti risultati:

1) assenza totale di neutralizzazione con l'antisiero  $A_4$  (totale azione citopatogena con diluizione iniziale del pool maggiore di 1:1024 in presenza di siero diluito 1:2);

2) parziale neutralizzazione con l'antisiero O (effetto citopatogeno con una diluizione iniziale del pool di 1:16 in presenza di siero diluito 1:2).

Il test di inibizione del pool contenente sia il virus O che A<sub>4</sub>, inoculato dopo 8 ore, ha dato i seguenti risultati:

1) assenza totale di neutralizzazione con l'antisiero A<sub>4</sub> (totale azione citopatogena con una diluizione iniziale del pool maggiore di 1:1024 in presenza di siero diluito 1:2);

2) parziale neutralizzazione con l'antisiero O (effetto citopatogeno con una diluizione iniziale del pool di 1:4 in presenza di siero diluito 1:2).

I risultati sono schematizzati nella tavola annessa.

In base alle nostre esperienze possiamo concludere che quando il virus in competizione (tipo A<sub>4</sub>) viene insemenato 4 ore dopo il primo virus (tipo O), si verifica una parziale inibizione da parte del virus tipo O nei riguardi del virus tipo A<sub>4</sub>. Tale fenomeno si manifesta con più evidenza quando il virus in competizione viene insemenato 8 ore dopo il primo virus.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) D'AMORE A., ORFEI Z., RAVAIOLI L., MAZZARACCHIO V., CASTAGNOLI B. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 21: 258 (1958).
  - (<sup>2</sup>) UBERTINI B. - Zooprofilassi, 2: 324 (1947).
  - (<sup>3</sup>) ORFEI Z. - Zooprofilassi, 11: 285 (1956).
  - (<sup>4</sup>) RAVAIOLI L., ORFEI Z., D'AMORE A., MAZZARACCHIO V., CASTAGNOLI B. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 21: 252 (1958).
-