

66. A. D'AMORE, Z. ORFEI, L. RAVAIOLI, V. MAZZARACCHIO, B. CASTAGNOLI. —
Il virus aftoso su coltura di tessuti "in vitro". — Nota VI.
Preparazione e titolazione del siero antiaftoso ottenuto dal
bovino.

Riassunto. — Allo scopo di produrre siero-immune, gli AA., trattano due bovini con virus aftoso tipo « O » ottenuto su colture in vitro di cellule renali tripsinizzate di suino. Durante l'immunizzazione protrattasi per oltre quattro mesi, per mezzo della neutralizzazione in vitro, viene seguito il procedere del fenomeno immunitario umorale. Alla fine dell'immunizzazione i titoli neutralizzanti massimi sono stati rispettivamente di 1/4504 ed 1/6666.

Durante l'immunizzazione la ricerca del virus dall'urina, dai tamponi faringei e rettali è stata costantemente negativa per un bovino, mentre è stata positiva varie volte ed a tempi diversi per l'altro.

Résumé. — Les auteurs, dans le but d'obtenir du serum immunisé, traitent deux boeufs avec du virus aphteux du type « O » obtenu sur des cultures in vitro de cellules rénales tripsinisées de porc. Pendant l'immunisation, qui a eu une durée de plus que 4 mois, on suit — au moyen de la neutralisation in vitro — le processus du phénomène immunitaire humoral. A la fin de l'immunisation, les titres neutralisants maxima ont été, respectivement de 1/4504 et 1/6666.

Pendant l'immunisation, la recherche du virus dans l'urine, dans les badigeons pharyngiens et rectaux a toujours été négative pour l'un des boeufs, tandis qu'elle s'est présentée positive plusieurs fois et à des moments différents, pour l'autre.

Summary. — In order to produce immune sera, two cattle were treated with type « O » foot and mouth virus obtained from « in vitro » cultures of trypsinised porcine renal cells. The progress of the humoral immunisation phenomenon was followed by « in vitro » neutralisation during the immunisation extended over a period of more than four months. At the end of the immunisation the maximal neutralising titres were 1/4,504 and 1/6,666 respectively.

The examination of the urine, pharyngeal and rectal swabs for the virus during the immunisation gave consistently negative results for one animal, but were sometimes positive at various times for the other.

Zusammenfassung. — Zwecks Darstellung von Serum-Immunen behandeln die Verfasser zwei Rinder mit Aphthenvirus des Typus « O » der in vitro durch Züchtung auf tripsinisierten Schweinsnierenzellen erhalten wurde. Während der Immunisierungsbehandlung die mehr als 4 Monate dauerte wird das Fortschreiten der Immunisierung durch Neutralisierung in vitro verfolgt. Die maximalen Neutralisierungswerte am Ende der Immunisierung waren $1/4504$ bzw. $1/6666$.

Während der Immunisierung waren die Virusbefunde im Harn und in den Rachen und Analtamponen in einem Fall stets negativ, während sie im anderen Falle einige Male und für verschiedene Zeitspannen positiv waren.

Da quando LÖFFLER ⁽¹⁾ nel 1899 dimostrò come fosse possibile, sebbene molto oneroso, ottenere siero immune antiaftoso dai bovini, e NOCARD ⁽¹⁾ nel 1903 ne confermò e dimostrò l'utilità pratica, la produzione e l'uso di tale siero ha provocato una lunga serie di lavori e ricerche.

Oggi potrebbe sembrare fuori tempo il ritorno alla siero-profilassi ed ai problemi che ad essa si legano, dato l'odierno indirizzo della profilassi antiaftosa verso più attuali ed efficaci mezzi di prevenzione e contenzione della malattia.

Tuttavia noi riteniamo che la messa a punto di tecniche sempre più precise possa contribuire anche indirettamente a controllare e ad eliminare questa infezione.

Tra i maggiori problemi da risolvere nella produzione del siero immune vi sono quelli della disponibilità di forti quantitativi di virus purificato da inoculare e di un'esatta tecnica di titolazione del siero immune ottenuto. Tali problemi possono oggi considerarsi avviati a soluzione con l'uso delle colture di tessuti « in vitro ».

Nel quadro delle ricerche sulla biologia del virus aftoso coltivato su cellule renali tripsinizzate di suino, ci siamo proposti, col presente lavoro, di mettere a punto la tecnica di immunizzazione del bovino e l'esatta titolazione del siero così ottenuto.

MATERIALE E METODO

Coltura di tessuto. Si sono usate cellule renali tripsinizzate di suino secondo la tecnica già descritta da uno di noi ⁽²⁾.

Virus. E' stato usato il virus aftoso tipo « O » coltivato, in fiasche di Roux, su cellule renali tripsinizzate di suino. Il virus è stato raccolto in 18^a ora di sviluppo, distribuito in fiale da 20 cm³ e conservato a —25°C.

Produzione del siero immune. Per la produzione del siero si sono usati due giovani bovini. Ogni bovino ha ricevuto tre inoculazioni sottocutanee, alla distanza di quindici giorni l'una dall'altra, di vaccino tipo « O » nella dose di 30 cm³ per ogni vaccinazione e quindi cinque inoculazioni endovenose, alla distanza di circa quindici giorni l'una dall'altra, di sospensione virale attiva rispettivamente nelle dosi di 10, 20, 30, 40 e 50 cm³. Dopo un riposo di quattro mesi i bovini hanno ricevuto una sesta inoculazione endovenosa di 60 cm³ di virus coltura. I salassi sono stati eseguiti prima della vaccinazione, dopo la seconda e la terza inoculazione di vaccino, prima di ciascuna inoculazione endovenosa di virus-coltura e dopo venti giorni dall'ultima inoculazione di richiamo (v. tabella).

Sono stati prelevati inoltre, a distanza di 2, 7, 15 giorni dalle inoculazioni di virus, tamponi faringei e rettali, campioni d'urina per mettere in evidenza una eventuale eliminazione di virus attraverso queste vie.

Test di neutralizzazione. Le varie diluizioni del siero (inattivato a 56°C per 30') da titolare, in base 2, (1/2; 1/4; 1/8; ecc.), sono state mescolate con uguali quantità di virus diluito in modo che in cm³ 0,1 fossero contenute 100-150 DCPT₅₀.

La miscela virus-siero è stata tenuta a temperatura ambiente (22°C) per un'ora e quindi inoculata in cinque tubi-coltura per ciascuna diluizione nella quantità di cm³ 0,2 per tubo. La lettura dei risultati è stata eseguita dopo 24, 48, 72, 96 ore dalla inoculazione ed il titolo limite di neutralizzazione del siero è stato calcolato secondo il metodo di REED e MUENCH (3).

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati delle nostre prove sono riassunti dai dati della tabella e dai grafici n. 1 e n. 2 annessi, dove sono indicati i valori raggiunti dai sieri immuni. I titoli neutralizzanti al quarto mese dall'inizio dell'immunizzazione sono stati di 1/4504 ed 1/6666 rispettivamente per il bovino n. 1 e n. 2. Da essi è possibile concludere come la tecnica delle colture di tessuti adottata, oltre dare la disponibilità di grandi quantitativi di virus purificato, permetta, con la sieroneutralizzazione, di seguire il progredire dell'immunizzazione di ogni singolo animale con tecnica semplice, esatta e relativamente poco costosa a paragone dei metodi di controllo su animali.

L'isolamento del virus aftoso dalle feci, dai tamponi faringei e dalle

TABELLA 1

Giorni	Inoculazione antigene	Salassi	Titoli sieri bovini	
			n° 1	n° 2
0		pre-siero	1 : 45	1 : 84
6	I inoc. sottc.			
20	II inoc. sottc.			
34		I salasso	1 : 175	1 : 757
35	III inoc. sottc.			
51		II »	1 : 355	1 : 512
52	inoc. in vena 10 cm ³ virus			
59		III »	1 : 597	1 : 1179
60	inoc. in vena 20 cm ³ virus			
65		IV »	1 : 763	1 : 1024
66	inoc. in vena 30 cm ³ virus			
82		V »	1 : 1024	1 : 3154
83	inoc. in vena 40 cm ³ virus			
103		VI »	1 : 3355	1 : 5617
104	inoc. in vena 50 cm ³ virus			
124		VII »	1 : 4504	1 : 6666
257		VIII »	1 : 413	1 : 354
258	inoc. in vena 60 cm ³ virus			
274		IX »	1 : 2358	1 : 4716

urine è risultato costantemente negativo per il bovino n. 2. Dal bovino n. 1 invece si è isolato il virus in tre periodi diversi e precisamente dopo due

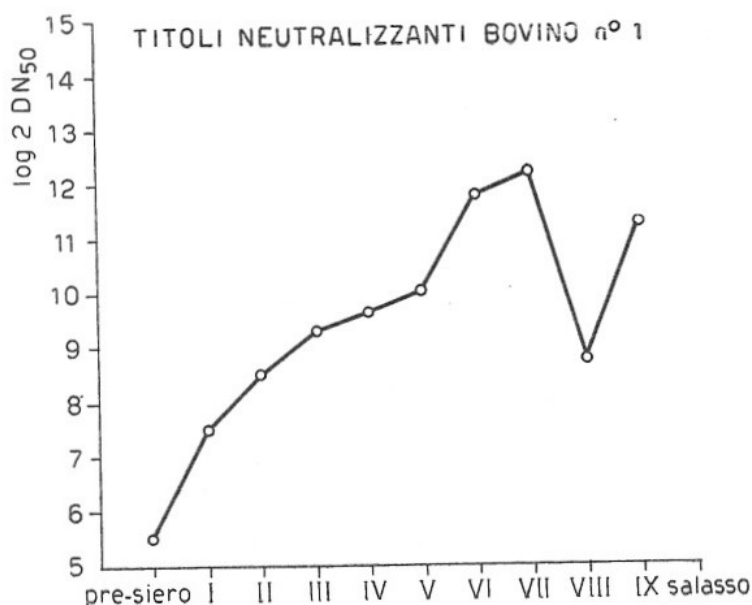


Fig. 1.

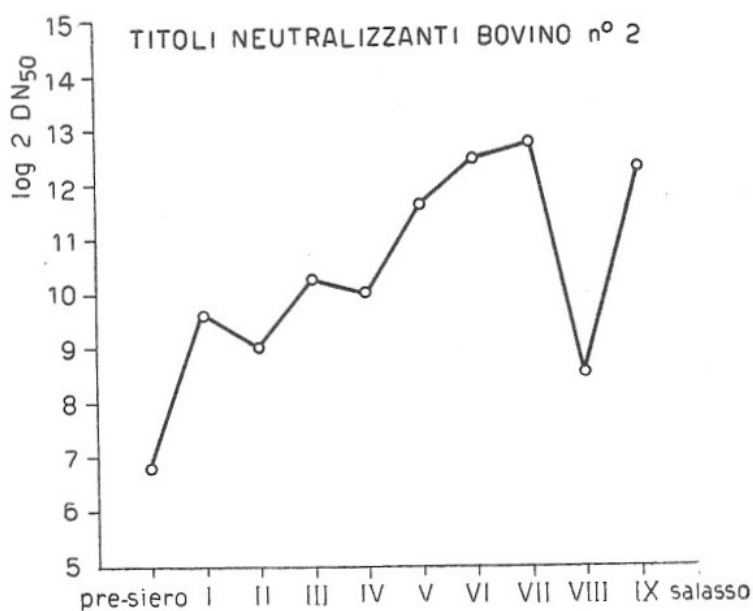


Fig. 2.

giorni dalla quarta inoculazione (feci), dopo quindici dalla quinta (urina), e dopo due dalla sesta (tampone faringeo).

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PANISSET L. - *Traité des maladies infectieuses des animaux domestiques* - Ed. Vigot Frères, Paris VI (1938).
- (²) ORFEI Z. - *Zooprofilassi*, 11: 283 (1956).
- (³) REED L. e MUENCH H. - *Am. J. Hyg.*, 27: 493 (1938).