

31. A. FELICI, V. RENNA e R. VOZZA. — La infezione tracomatosa sperimentale. - Studio clinico virologico.

Riassunto. — Vengono riportati i dati clinici e virologici relativi a 27 casi di infezione tracomatosa indotta sperimentalmente impiegando un ceppo di virus isolato dagli A.A. in Eritrea.

I volontari suddivisi in gruppi sono stati inoculati con quantità titolate differenti di corpi elementari. Si è così osservato che inoculi contenenti meno di 1 DIU₅₀ sembrano contenere un numero di corpi elementari limite capace di scatenare la infezione. Con tale dose si è osservata la comparsa di una malattia a decorso cronico e ad inizio insidioso simile a quella naturale mentre con inoculi superiori essa ha sempre dimostrato caratteri di acuzie.

Il virus è stato reisolato più volte nel corso dell'esperimento dalla mucosa congiuntivale e nasale ove però non è stato possibile dimostrare con certezza la presenza di inclusi che erano invece presenti in notevole numero a livello della congiuntiva e della cornea.

Summary. — Clinical and virological data relative to 27 cases of trachomatous experimental infection are reported.

Different amount of titrated inocula were used and, with the exception of one case, all individuals inoculated with more than 1 EID₅₀ developed the disease showing however different clinical and virological findings. A mild disease with insidious onset and chronic course was recorded when lower doses of inoculum were used.

One of these individuals failed to develop the disease probably in relation to the borderline inoculum used.

Virus isolations were obtained from the conjunctival and from the nasal scraping.

Inclusions were found also in the corneal epithelium.

Il Comitato di Esperti del tracoma, ha stabilito nel 1955 ⁽¹⁾ che, in rapporto alla mancanza di un ospite, diverso dall'uomo, dimostratamente suscettibile, in ogni caso, alla infezione tracomatosa, l'unico criterio utilizzabile per la identificazione di eventuali agenti isolati quali responsabili della infezione tracomatosa debba consistere nella trasmissione di una malattia con tutti i caratteri, clinici e di laboratorio, della infezione tracomatosa, in soggetti umani volontari. La diagnosi clinica di tracoma, deve inoltre essere stabilita separatamente da due oculisti dotati di particolare esperienza di questo campo.

Nel maggio-giugno 1960, sono stati isolati in questo laboratorio, sette ceppi di corpuscoli elementari, da soggetti affetti da tracoma in fase attiva. Con uno di tali ceppi, Tracoma/Asmara/3/1960, si è proceduto alla infezione sperimentale di due soggetti volontari (Esp. 1). La evoluzione clinica della infezione sperimentale è stata seguita, separatamente, da tre oculisti con particolare esperienza in questo campo quali il prof. P. GUERRA, direttore del Centro Oftalmico di Asmara e Senior Adviser per il tracoma della WHO; il dott. R. VOZZA della Clinica Oculistica della Università di Roma, assistente oculista nel piano delle ricerche e il dott. C. FERRACIOLO assistente oftalmologo presso il Centro Oftalmico di Asmara.

Dopo questo esperimento, sono stati eseguiti 6 successivi esperimenti di infezione sperimentale l'ultimo dei quali eseguito il 9-6-1961. Due di questi esperimenti (Esp. n. 2 e 4), sono stati condotti quali controllo di due esperimenti di prevenzione della malattia sperimentale (^{2,3}). Gli altri esperimenti hanno avuto lo scopo, in primo luogo di controllare se il successivo passaggio in uovo del ceppo di corpuscoli elementari considerato, si accompagnasse ad una eventuale attenuazione della patogenicità per la congiuntiva umana ed in secondo luogo di permettere uno studio più approfondito delle caratteristiche cliniche e di laboratorio che accompagnano la malattia sperimentale.

La diagnosi clinica di tracoma sperimentale si è basata, per i primi quattro esperimenti sul giudizio separato dei tre oculisti citati. Nei successivi esperimenti, il dott. V. RENNA, della Clinica Oculistica della Università di Roma, ha sostituito il dott. R. VOZZA.

La diagnosi di laboratorio di infezione tracomatosa sperimentale è stata basata sul successivo reisolamento dei corpuscoli elementari dalle lesioni congiuntivali, nonchè sulla dimostrazione e valutazione del numero delle inclusioni citoplasmatiche.

SOGGETTI VOLONTARI E MATERIALI: Tutti gli esperimenti descritti, sono stati eseguiti, presso l'Ospedale Oftalmico Hailé Sellassié I di Asmara, diretto dal prof. GUERRA, su volontari di entrambi i sessi, nei quali la funzione visiva di uno o di entrambi gli occhi, era totalmente persa in rapporto a malattie oculari di varia natura. I soggetti sono stati controllati quotidianamente affinchè fosse evitato ogni eventuale trattamento terapeutico che potesse interferire con la infezione sperimentale in atto.

Alla fine dell'esperimento i vari soggetti sono stati sottoposti ad un trattamento combinato, locale e generale, antibiotico e chemioterapico e controllati sino alla totale scomparsa di qualsiasi manifestazione clinica.

Soggetti volontari: Sono stati studiati individui di ambo i sessi e di varie età, di razza arabo-semitica, ricoverati per malattie oculari di varia natura. Tutti i soggetti avevano residui cicatriziali dovuti con ogni probabilità ad una pregressa infezione tracomatosa. In tutti i soggetti trattati è stato praticato, una settimana prima della inoculazione, uno striscio congiuntivale ed un tentativo di isolamento in uova embrionate. In tutti i casi si sono avuti risultati negativi; il tentativo di isolamento non è andato oltre il primo passaggio.

Sono stati complessivamente studiati 27 soggetti, in maggioranza maschi, e di età compresa prevalentemente tra 10 e 20 anni.

Inoculo: In tutti gli esperimenti citati è stato impiegato lo stesso ceppo di corpuscoli elementari tracomatosi, Asmara/3/1960. In due esperimenti (Esp. 1 e 4), l'uovo dal quale proveniva la membrana utilizzata, era rimasto vitale sino al momento della sua apertura, negli altri esperimento l'uovo era morto tra la 6^a e l'8^a giornata dalla inoculazione. Le membrane utilizzate, tutte notevolmente ricche in corpuscoli elementari, erano state mantenute a -50°C per periodi oscillanti da alcune settimane ad un mese. Al momento del suo impiego, la membrana veniva scongelata rapidamente, diluita 1:3 circa PGS (⁴) contenente streptomicina 5000 gamma/0,25 cm³ ed agitata in presenza di palline di vetro. La sospensione ottenuta veniva impiegata come inoculo nella quantità di due gocce (circa 0,05 cm³) ed il rimanente diluito 10^{-1} , 10^{-2} , e 10^{-3} veniva immediatamente titolato in uovo. Nell'esperimento n. 4, l'inoculo è stato rappresentato rispettivamente dalle diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} , e 10^{-3} della membrana adoperata. Per la titolazione, le uova sono state inoculate nel volume di 0,2 cm³; le uova morte entro tre giorni dalla inoculazione sono state scartate. Le uova morte nei giorni successivi sono state controllate microscopicamente per la presenza di corpuscoli elementari. Tutte le uova eventualmente rimaste vitali, sono state aperte e controllate microscopicamente verso l'11^o giorno della inoculazione.

Il titolo finale, raggiunto dall'inoculo è stato espresso come DIU₅₀^(*) utilizzando la formula di Kaerber. In alcuni casi però si è avuta una discrepanza tra titolo 50%, come determinato in base alla formula di Kaerber e titolo infettante 50% come risultato della lettura diretta dell'esperimento, senza elaborazione in base alla formula di Kaerber. In questi casi si è preferito riferire il titolo infettante 50% come esso derivava dall'esperimento (Esp. 4 e 5).

(*) DIU₅₀ = Dosi infettanti uovo 50%.

Antigene per la prova cutanea: Sono state impiegate sospensioni purificate con etere, dei seguenti ceppi di corpuscoli elementari tracomatosi, SA1, SA2 (*) ed Asmara/3/1960, ad una diluizione pari al 5% del sacco del tuorlo infetto. Una sospensione 5% di membrane da uova normali al 15° giorno di incubazione, analogamente trattata è stata impiegata come antigene controllo.

Antigene per la reazione di fissazione del complemento: E' stata impiegata una sospensione di corpuscoli elementari del ceppo Asmara, 3/1960, purificata con etere, contenente, nel volume di una goccia, 2 unità antigeniche.

METODI.

Raccolta degli strisci e dei prelievi congiuntivali: Questa è stata effettuata con una spatola metallica, raschiando, lo strato superficiale della congiuntiva. Metà del materiale asportato è stato raccolto su piccoli dischi di vetro che venivano quindi immersi in containers contenenti 1 cm³ di PGS. Ciascun prelievo veniva quindi inoculato nella quantità di 0,25 cm³, in quattro uova in 6^a gg. di incubazione. Il materiale rimasto sulla spatola veniva quindi strisciato su un vetrino e colorato con Giemsa. Gli strisci così colorati venivano osservati microscopicamente per 30 minuti.

Raccolta dei prelievi nasali: Il prelievo nasale è stato raccolto da un medico otorinolaringoiatra, mediante raschiamento della mucosa nasale situata allo sbocco del canale naso-lacrimale, previa anestesia di superficie con procaina al 2%. Il materiale così raccolto è stato in parte utilizzato per l'isolamento ed in parte strisciato per l'esame morfologico.

Raccolta del prelievo corneale: Questo prelievo è stato effettuato, previa anestesia per instillazione con procaina al 2%, raschiando, con un coltellino di Graefe, l'epitelio corneale. Con il materiale raccolto si è allestito un vetrino per l'esame morfologico.

Biopsia della mucosa congiuntivale: Questa è stata effettuata previa anestesia per infiltrazione con procaina al 4%, asportando un piccolo cuneo di tessuto dalla congiuntiva tarsale superiore al margine superiore del tarso.

(*) I ceppi di corpuscoli elementari SA1 e SA2 ci sono stati gentilmente inviati dal Dott. E. S. MURRAY della Università di Harvard.

Prova cutanea: E' stata effettuata, inoculando sulla superficie flessoria dell'avambraccio, mediante una siringa da tuberculina con ago ipodermico, una piccola quantità di antigene sino alla formazione di un piccolo ponfo.

Reazione di fissazione del complemento: E' stato impiegato il micro-metodo di FULTON e DUMBELL su piastre di perspex con incubazione per 18 h a + 4°C (5).

RISULTATI.

EVOLUZIONE DELL'INFEZIONE SPERIMENTALE E DATI DI LABORATORIO.

1° Esperimento (11-6-1960).

Virus: 4° passaggio da un uovo rimasto vitale.

Titolo dell'inoculo: $10^{2.5}$ DIU₅₀/0.2 cm³ (KAERBER).

Numero approssimato delle DIU₅₀ impiegate: 80.

Risultato della titolazione dell'inoculo:

Diluizione dell'inoculo	Uova inoculate e sopravvissute oltre il 5° gg.	Uova positive	Uova negative	% Positive
10 ⁻¹	16	12	4	75
10 ⁻²	12	9	3	85
10 ⁻³	10	4	6	40

Risultato della malattia sperimentale:

	Età	Sesso	Giorni della inoculazione					
			4° gg.			13° gg.		
			Tr*	Isol.	Striscio	Tr.	Isol.	Striscio
Caso A.A.	12 a.	M	f +	—	—	f + +	1° p.u.**	**** 12 30'
Caso K.Z.	13 a.	M	C + ***	—	—	f + + p + +	1° p.u.	15 30

	26° gg.		
	Tr.	Isol.	Striscio
Caso A.A.	f + + p + +	1° p.u.	Dubbio
Caso K.Z.	f + + p + +	Contam.	7/30'

* Tr. = Evoluzione del tracoma sperimentale secondo la classificazione di MAC CALLAN.

** p.u. = Passaggio in uovo.

*** C. = Congiuntivite acuta aspecifica.

**** 12/30 = Numero delle inclusioni riscontrate in trenta minuti di osservazione microscopica.

COMMENTO.

Impiegando 80 DIU₅₀ si è avuta in entrambi soggetti una malattia sperimentale chiara e virologicamente documentata.

2° Esperimento (5-9-1960).

Virus: 12° passaggio da un uovo morto.

Titolo dell'inoculo: 10^{2.5} DIU₅₀/0.2 cm³ (KAERBER).

Numero approssimativo delle DIU₅₀ impiegate: 125.

Risultato della titolazione dell'inoculo:

Diluizione dell'inoculo	Uova inoculate e sopravvissute oltre il 3° gg.	Uova positive	Uova negative	% positive
10 ⁻¹	10	8	2	80
10 ⁻²	12	12	0	100
10 ⁻³	15	3	12	20

Risultato della malattia sperimentale:

Caso	Età	Sesso	Giorni della inoculazione				
			7° gg.			14° gg.	21° gg.
			Tr.	Isol.	Striscio	Tr.	Tr.
31	16	M	C+	1° p.u.	13/30'	f++p++	f++p++
32	17	M	f++p++	neg.	3/30'	dimesso	dimesso
33	15	M	c++	1° p.u.	33/30'	f++p++	f++p++
34	13	M	f+p++	1° p.u.	15/30'	f+p++	f+p++
35	17	F	f++	neg.	0/30'	f+	f+
36	15	F	f++p++	1° p.u.	56/30'	f++p++ (00)	f++p++ (00)
41	14	M	C+++	1° p.u.	12/30'	f++p++	f+p+++
60	13	F	f++	neg.	0/30'	dimesso	dimesso

COMMENTO.

Anche in questo esperimento, impiegando il 80 DIU₅₀, si è avuta una malattia sperimentale conclamata, associata in tutti i casi, tranne due, ai segni virologici di infezione.

Nel caso n. 36 si è avuto, verso il 10° giorno dalla inoculazione, il passaggio della infezione all'occhio non inoculato.

Il caso n. 60 per ragioni contingenti non è stato seguito oltre il 12° giorno dalla inoculazione. Malgrado entro tale data le ricerche di labora-

torio fossero state negative, il soggetto presentava chiari segni clinici di una infezione tracomatosa.

Il caso n. 35 ha presentato una infezione di lieve entità e gli accertamenti virologici eseguiti in 7^a giornata dalla inoculazione hanno avuto risultati negativi. Il successivo controllo virologico eseguito in 15^a giornata ha fornito risultati dubbi per quanto riguarda la ricerca delle inclusioni citoplasmatiche mentre il tentativo di isolamento in uovo è rimasto inquinato.

Ad eccezione del reperto clinico quindi, per quanto riguarda i casi n. 35 e 60, non si dispone purtroppo di dati virologici per porre, con assoluta certezza, una diagnosi di infezione tracomatosa, per quanto questa fosse clinicamente molto probabile.

Esperimento n. 3 (26-9-1960).

Virus: 12^o passaggio da un uovo morto.

Titolo dell'inoculo $< 10^1$ DIU₅₀/0.2 cm³.

Numero approssimativo delle DIU₅₀ impiegate: $< 0,25$.

Risultato della titolazione dell'inoculo:

Diluizione dell'inoculo	Uova inoculate e sopravvissute oltre il 3 ^o gg.	Uova positive	Uova negative	% positive
10 ⁻¹	8	0	8	0

Risultato della malattia sperimentale:

Caso	Sesso	Età	Giorni della inoculazione				
			7 ^o gg.			14 ^o gg.	21 ^o gg.
			Tr.	Isol.	Striscio	Tr.	Tr.
K.R.	M	17	f + +	1 ^o p.u.	11/30'	f + + p + +	f + + p + +
W.W.	M	14	C +	contam.	8/30'	f + + p +	f + + p + +

COMMENTO.

L'epoca di questo esperimento ha coinciso con un periodo di scarsissima suscettibilità delle uova (Tavola 1) ed il risultato, apparentemente strano, è stato che mentre l'inoculazione in uova non ha dimostrato la presenza di un virus nell'inoculo, la congiuntiva umana ha, ciononostante, sviluppato una chiara infezione tracomatosa. Si potrebbe de-

durre che la suscettibilità della congiuntiva umana è superiore a quella della membrana del sacco del tuorlo, di alcune uova, in periodi particolari, nello svelare la presenza di scarse particelle virali. Queste, anche in piccolo numero sono capaci di una rapida moltiplicazione a livello della congiuntiva umana, come confermato dalla entità delle manifestazioni cliniche e della successiva possibilità di reisolamento del caso K.R.

Riteniamo che questo strano comportamento sia dovuto ad una differente suscettibilità delle uova, differenza probabilmente non solo stagionale, ma anche, secondo la nostra esperienza, estemporanea ed imprevedibile. Il subpassaggio di un uovo senza corpuscoli microscopicamente rilevabili, appartenente ad uno esperimento « negativo » si è accompagnato alla ricomparsa delle particelle virali (Esp. 6).

4° Esperimento (24-1-1961).

Virus: 20° passaggio da un uovo rimasto vivo.

Titolo dell'inoculo: 10^3 DIU₅₀/0.2 cm³ (50% reale).

Numero approssimato delle DIU₅₀ impiegate: 0,25, 2,5 e 25.

Risultato della titolazione dell'inoculo:

Diluizione dell'inoculo	Uova inoculate sopravvissute oltre il 3° gg.	Uova positive	Uova negative	% positive
10 ⁻¹	10	7	3	70
10 ⁻²	7	5	2	71
10 ⁻³	8	4	4	50

Risultato della malattia sperimentale:

Caso	N. DIU ₅₀ impiegate	Quadro clinico	Inclusioni	Isolamento
40	25	Congiun. ac 2 ^a gg.	6 30	neg.
33	25	» »	6/30	1° p.u.
31	25	» »	3 30'	neg.
41	2,5	Congiun. ac. 3 ^a gg.	15/30'	neg.
45	2,5	Congiun. ac. 2 ^a gg.	2 30'	neg.
42	2,5	Congiun. ac. 4 ^a gg.	3 30'	1° p.u.
36	0.25	Nulla	0 30'	neg.
46	0.25	Congiun. ac. 4 ^a gg.	1 30'	neg.
39	0.25	» »	2 30'	neg.
47	0.25	» »	±/30'	neg.

COMMENTO.

L'impiego di differenti quantità di DIU_{50} ha avuto un risultato leggermente diverso come appare dal controllo clinico e dal controllo virologico dei casi trattati.

Purtroppo dal punto di vista clinico, ad eccezione della mancata insorgenza della infezione del caso 36, l'unico dato riguarda l'epoca di insorgenza della infezione congiuntivale mentre non si hanno dati sul decorso ulteriore della malattia essendo i soggetti stati trattati a 10 giorni dalla inoculazione. (Questo esperimento ha avuto come scopo non già lo studio della malattia sperimentale ma il controllo della attività di differenti dosi di un inoculo adoperato come challenge di un esperimento di vaccinazione ⁽³⁾).

Dal punto di vista virologico si è constatata la differente entità del numero delle cellule contenenti inclusioni citoplasmatiche, osservate in 30' di osservazione microscopica da un lato e la incidenza dei tentativi di isolamento positivi, tra questo esperimento e l'esperimento n. 2, nel quale sono state impiegate approssimativamente 80 DIU_{50} .

Rimanendo a questo esperimento, fatta eccezione per il caso n. 41, sembra essersi delineata una graduale diminuzione del numero delle inclusioni citoplasmatiche man mano che si è adoperato l'inoculo meno concentrato, mentre la possibilità di isolamento presente negli individui inoculati con 25 e 2,5 DIU_{50} , è scomparsa negli individui inoculati con 0,25 DIU_{50} .

Di particolare interesse a questo riguardo è invece il dato di fatto che il caso n. 36 non sia infettato.

Il paragone precedente con l'esp. 2 può essere fatto, nelle grandi linee, in quanto la differente incidenza di isolamento potrebbe essere dovuta alla differente suscettibilità delle uova nei due diversi esperimenti in cui le due prove sono state condotte ed il diverso numero delle inclusioni citoplasmatiche rispecchiare coincidenze di altra natura o differenti capacità di reazione individuale (esemp. caso 41 qualora paragonato ai casi 45 e 42).

5° Esperimento (19-6-1961).

Virus: 23 passaggio da un uomo morto.

Titolo dell'inoculo: 10^3 $DIU_{50}/0.2$ cm³ (50% reale).

Numero approssimato delle DIU_{50} impiegate: 250.

Risultato della titolazione dell'inoculo:

Diluizione dell' inoculo	Uova inoculate e sopravvissute oltre il 3 ^o gg.	Uova positive	Uova negative	% positive
10 ⁻¹	11	6	5	54
10 ⁻²	14	11	3	78
10 ⁻³	8	4	4	50

Risultato della malattia sperimentale:

Caso 03	Giorni dalla inoculazione				
	3 gg.	5 gg.	8 gg.	14 gg.	17 gg.
Diagnosi	C +	TrIf + p +	TrIIIf + + p + + + *	TrIIIf + + p + + +	TrIIIf + + p + +
Inclusi:					
Ep. cong.	—	—	±/30	±/30	±/30
Ep. corn.	—	—	—	—	—
Ep. nasale	—	—	—	—	—
Isolamento:					
Occhio	—	—	+ 1 ^o p.u.	+ 1 ^o p.u.	+ 1 ^o p.u.
Naso	—	—	—	—	—
R.F.C.			< 1/4		

* Cheratite avascolare disseminata, osservata alla lampada a fessura, previa colorazione con fluorescinato di sodio al 10%.

Caso 03	Giorni dalla inoculazione				
	21 gg.	24 gg.	29 gg.	40 gg.	51 gg.
Diagnosi	TrIIIf + + + p + + +	TrIIIf + + + p + + +	TrIIIf + + + p + + +	TrIIIf + + + p + + +	TrIIIf + + + p + + +
Inclusi:					
Ep. cong.	24/30'	16/30'	12/30'	8/30'	8/30'
Ep. corn.	—	—	—	15/30'	—
Ep. nasale	—	—	3/30 *	—	—
Isolamento:					
Occhio	—	+ 1 ^o p.u.	+ 1 ^o p.u.	+ 1 ^o p.u.	—
Naso	—	—	+ 1 ^o p.u.	—	—
R.F.C.				1:16	

* Vedere il commento finale.

Caso 04 - Questo caso, seguito per 35 gg, non ha presentato alcun segno clinico e virologico di infezione.

COMMENTO.

Questo esperimento ha fornito un risultato sorprendente ed unico nella nostra casistica. Infatti dei 2 soggetti inoculati con 250 DIU₅₀, uno ha presentato una infezione tracomatosa conclamata mentre l'altro non ha presentato alcun segno clinico o virologico di infezione. Due successivi prelievi di sangue eseguiti in 6^a e 30^a giornata dalla inoculazione, nel caso negativo non hanno posto in evidenza la presenza di anticorpi devianti il complemento essendo la prima diluizione saggiata 1:4.

6° Esperimento (19-6-1961).

Virus: 23° passaggio da uovo morto.

Titolo dell'inoculum: 10^{3,04} DIU₅₀/0,2 cm³ (KAERBER).

Numero approssimativo delle DIU₅₀ impiegate: $\simeq$ 250.

Risultato della titolazione dell'inoculum:

Diluizioni	Uova inoculate e sopravvissute oltre il 3° gg.	Uova positive	Uova negative	% Positive
10 ⁻¹	10	9	1	90
10 ⁻²	15	15	0	100
10 ⁻³	11	7	4	64

Risultato della infezione sperimentale:

Caso O2	Giorni dalla inoculazione				
	3 gg.	5 gg.	8 gg.	14 gg.	17 gg.
Diagnosi	N.	N.	C +	C +	Trf + p +
Inclusi:					
Epit. nasale	—	—	0/30'	—	8/30'
Epit. Cong.	—	—	—	—	—
Isolamento:					
Occhio	—	—	+ 1° p.u.	—	+ 1° p.u.
Naso	—	—	—	—	—

Caso 02	Giorni dalla inoculazione				
	21 gg.	24 gg.	29 gg.	40 gg.	51 gg.
Diagnosi	TrIf + p +	TrIIf + + p + +	TrIIf + + + p + + +	TrIIf + + + p + + +	TrIIf + + + p + + +
Inclusi :					
Ep. nasale	—	6/30'	illegg.	0/30'	0/30'
Ep. Cong.	—				
Isolamento :					
Occhio	—	+ 2° p.u.	+ 4° p.u.	—	—
Naso	—	—	+ 4° p.u.	—	—

Caso 04	Giorni dalla inoculazione				
	3 gg.	5 gg.	8 gg.	14 gg.	17 gg.
Diagnosi	C + +	C + + +	TrIf + p +	TrIf + p +	TrIf + p +
Inclusi :					
Ep. cong.	—	—	illeg.	0/30'	0/30'
Isolamento :					
Occhio	—	—	+ 2° p.u.	—	+ 1° p.u.

Caso 04	Giorni dalla inoculazione				
	21 gg.	24 gg.	29 gg.	40 gg.	51 gg.
Diagnosi	TrIf + p +	TrIf + p +	TrIf + p +	TrIf + p +	TrD
Inclusi :					
Ep. cong.	—	—	5/30'	6/30'	3/30'
Isolamento :					
Occhio	—	contam.	+ 4° p.u.	+ 4° p.u.	—

COMMENTO.

Tra i passaggi antecedenti della membrana adoperata in questo esperimento ve n'è uno, il 13°, in cui non si è rilevata la presenza del virus. Il successivo subpassaggio ha dato invece luogo alla comparsa di corpuscoli elementari che sono quindi sempre stati presenti nei successivi passaggi. E' probabile che il fenomeno sia da riferire alla variabile suscettibilità delle uova e che i corpuscoli elementari fossero in tale scarso numero da non essere stati ovviamente rivelabili.

In entrambi i soggetti (specie nel caso 04) si è avuta una malattia discreta caratterizzata, nel caso 02, dalla tardiva comparsa dei follicoli (17^a gg). Nel caso 04, il numero dei follicoli è stato relativamente scarso per tutta la durata dell'osservazione, mentre nel caso 02 si è avuta, specie nel periodo tardivo dell'osservazione una discrepanza fra entità delle manifestazioni cliniche e reperto delle inclusioni citoplasmatiche.

7° Esperimento (19-6-1961).

Virus: 28° passaggio da un uovo morto.

Titolo dell'inoculo: 10^1 DIU₅₀/0,2 cm³ (30% reale).

Numero approssimato delle DIU₅₀ contenute nell'inoculo: 0,23.

Risultato della titolazione:

Diluizione dell'inoculo	Uova inoculate e sopravvissute oltre il 3° gg.	Uova positive	Uova negative	% Positive
10 ⁻¹	12	6	6	50

Risultato della infezione sperimentale

Caso 05	Giorni dalla inoculazione				
	3 gg.	5 gg.	8 gg.	14 gg.	17 gg.
Diagnosi	C +	C +	C +	C +	C +
Inclusi:					
Ep. cong.	—	—	0/30'	—	0/30'
Isolamento:					
Occhio	—	—	+ 2° p.u.	—	+ 1° p.u.

Caso 05	Giorni dalla inoculazione				
	21 gg.	24 gg.	29 gg.	40 gg.	51 gg.
Diagnosi	TrIf +	TrIf +	TrIf +	TrD	TrD
Inclusi:					
Ep. cong.	—	0/30'	1/30'	1/30'	3/30'
Isolamento:					
Occhio	—	+ 1° p.u.	+ 1° p.u.	contam.	+ 1° p.u.

COMMENTO.

L'inoculo adoperato per trasmettere l'infezione conteneva in questo caso 0,25 DIU₅₀, e, probabilmente in rapporto a questo basso inoculo, si è sviluppata una infezione sperimentale a lenta evoluzione e con scarse manifestazioni cliniche. L'indagine di laboratorio, ha messo in evidenza un numero scarso di inclusioni citoplasmatiche.

Questo esperimento si riallaccia all'esperimento n. 3, nel quale un inoculo con titolo analogo è stato saggiato su 4 soggetti in due dei quali è stata osservata una infezione sperimentale documentata dal rilevamento delle inclusioni citoplasmatiche mentre un soggetto non ha sviluppato alcun segno di infezione.

La comparsa tardiva (21^a gg.) di un numero molto scarso di follicoli, è stata l'unica manifestazione clinica presentata dal soggetto oltre ad una modesta congiuntivite aspecifica insorta subito dopo l'infezione.

La ricerca delle inclusioni citoplasmatiche ha dato i primi risultati positivi circa un mese dopo l'inoculazione mentre il reisolamento del virus è stato positivo sin dall'8^a gg. dalla inoculazione.

Diamo ora di seguito una descrizione clinica particolareggiata dei casi relativi agli esperimenti n. 3, 6 e 7.

TAVOLA 1

Percentuali delle uova infette, per mese, negli anni 1960 e 61:

Gennaio	—	Gennaio	38%
Febbraio	—	Febbraio	20%
Marzo	—	Marzo	12%
Aprile	—	Aprile	23%
Maggio	—	Maggio	10%
Giugno	84%	Giugno	39%
Luglio	80%	Luglio	66%
Agosto	36%	Agosto	44%
Settembre	9%	Settembre	17%
Ottobre	44%	Ottobre	—
Novembre	40%	Novembre	—
Dicembre	44%	Dicembre	—

CASO 02 - Individuo maschio di 15 anni affetto in OD da cataratta traumatica senza percezioni luminose e da strabismo divergente. Ha sofferto in passato di tracoma ed al momento dell'inoculazione presenta solo qualche modesta cicatrice ed un panno corneale lieve e modestamente vascolarizzato.

Inoculato in OD il 19-6-1961.

Esame clinico: (Osservazioni eseguite alla lampada a fessura).

5^a giornata - Nulla di rilevabile in OO.

8^a giornata - Il soggetto si lamenta di secchezza congiuntivale e lacrimazione in OD. Obiettivamente si osserva lieve edema ed iperemia della cong. tarsale superiore, della congiuntiva tarsale inferiore e della plica semilunare. Sulla prima è presente all'angolo interno, una discreta ipertrofia papillare ed all'angolo esterno qualche patecchia emorragica sottocongiuntivale.

Nulla di analogo nell'OS.

14^a giornata - Il quadro si mantiene pressochè invariato: qualche patecchia è comparsa nel fornice inferiore.

17^a giornata - Si osserva nell'OD modesta secrezione semifluida bianco-giallastra. L'edema e la congestione vasale sono notevolmente aumentati in tutti i settori congiuntivali, oltre che sulla caruncola e sulla plica semilunare. Anche la congiuntiva bulbare in corrispondenza del settore superiore del limbus corneale è congesta. I vasi corneali nella zona del vecchio panno, sono turgidi. L'ipertrofia papillare è notevolmente diffusa. All'angolo interno, lungo il bordo superiore del tarso, si notano 3-4 follicoli translucidi bianco-giallastri.

La colorazione della cornea con fluorescinato di sodio al 10% non rivela alterazioni epiteliali.

Il ganglio pretragico di destra è tumefatto e lievemente dolente.

21^a giornata - Altri follicoli bianco-giallastri, translucidi sono comparsi nel fornice inferiore, sul bordo inferiore del tarso, temporalmente.

Per il resto nessuna modificazione rispetto alla precedente osservazione e nessuna alterazione a carico dell'OS.

29^a giornata - Persiste l'edema e la congestione in tutti i settori della congiuntiva. E' sempre presente e notevole l'ipertrofia papillare e la congiuntiva bulbare, nel settore superiore, è particolarmente iperemica.

I follicoli del fornice inferiore sono aumentati di volume e numero, estendendosi a tutto il bordo inferiore del tarso.

Nessuna alterazione si mette in evidenza a carico dell'epitelio corneale dopo colorazione con fluorescinato di sodio al 10%.

Indenne l'OS.

40^a e 49^a giornata - Quadro del tutto simile al precedente.

51^a giornata - Pur potendosi osservare sempre, invariati di numero e volume i follicoli già notati nelle precedenti osservazioni, le papille, numerose e conglomerate fra loro in precedenza, sono ora più nette nei contorni e più appiattite.

La congestione e l'edema della congiuntiva sono diminuiti e i fenomeni di acuzie precedentemente osservati sembrano essersi affievoliti.

Anche il ganglio pretragico di Dx è meno tumefatto e meno dolente.

Nessuna alterazione corneale è visibile, anche dopo colorazione, e nulla è riscontrabile a carico dell'OS.

CASO 03 - Individuo di anni 14 il quale presenta in OD atrofia ottica di natura indeterminata ed in OS ectropion cicatriziale post-carbonchioso della palpebra superiore.

Ha sofferto in passato di tracoma ed al momento della inoculazione presenta in OD solo lievi cicatrici sulla congiuntiva della palpebra superiore.

Inoculato in OD il 19-6-1961.

Esame clinico - (osservazioni seguite alla lampada a fessura).

3^a giornata - Nell'OD è presente lieve iperemia e chemosi nei settori esterni della congiuntiva tarsale superiore e qualche petecchia.

Indenni il fornice e la congiuntiva tarsale inferiore e l'OS.

5^a giornata - Persistono le alterazioni già descritte a carico della congiuntiva tarsale superiore. Si notano inoltre edema della plica semilunare, congestione dei vasi della congiuntiva bulbare e numerose petecchie sotto la congiuntiva della palpebra superiore. E' insorta una discreta ipertrofia papillare e sono visibili tre follicoli rilevati nel settore interno, superiormente, sul bordo superiore del tarso.

Nessuna alterazione a carico della cornea dopo colorazione con fluorescinato di sodio al 10%.

8^a giornata - Il soggetto lamenta notevole senso di secchezza e sensazione di corpo estraneo in OD, presenta notevole secrezione giallastra semifluida. E' notevolmente aumentato l'edema e l'iperemia in tutti i settori congiuntivali, ma specie nei superiori. Numerose petecchie sono presenti. L'ipertrofia papillare è notevole ed i follicoli, aumentati di nu

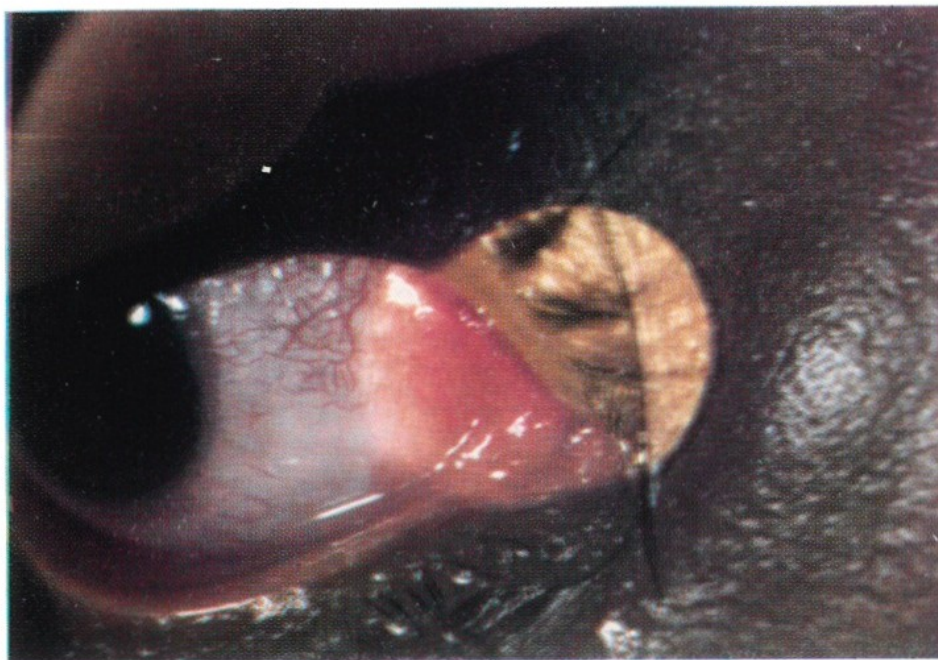


Fig. 1

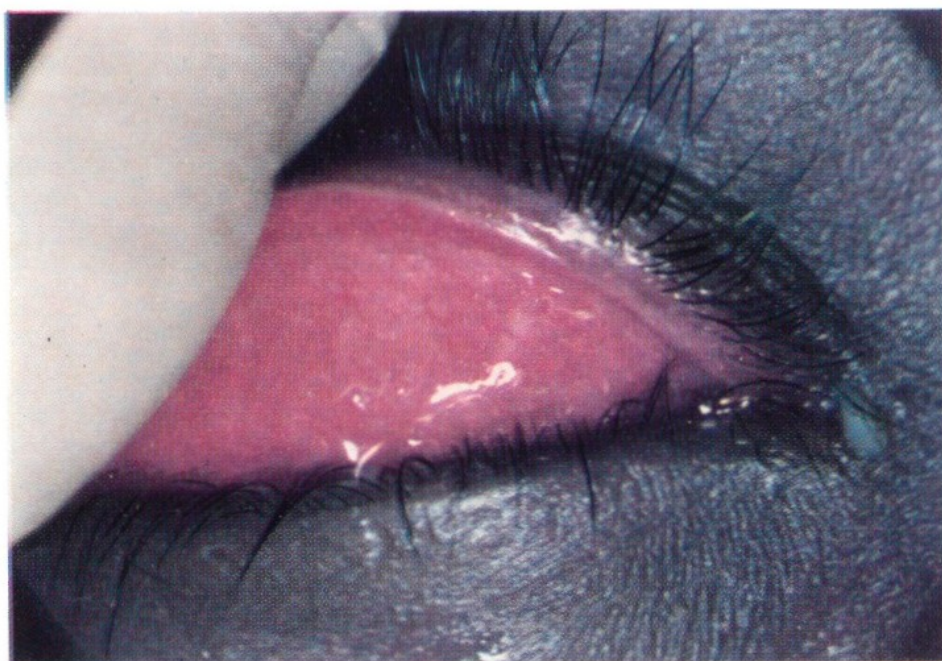


Fig. 2

Figg. 1, 2. - Aspetti clinici della infezione tracomatosa sperimentale in volontari umani (vedi testo).



Fig. 3

Fig. 4



Fig. 5

Figg. 3, 4, 5. - Aspetti clinici della infezione tracomatosa sperimentale in volontari umani (vedi testo).

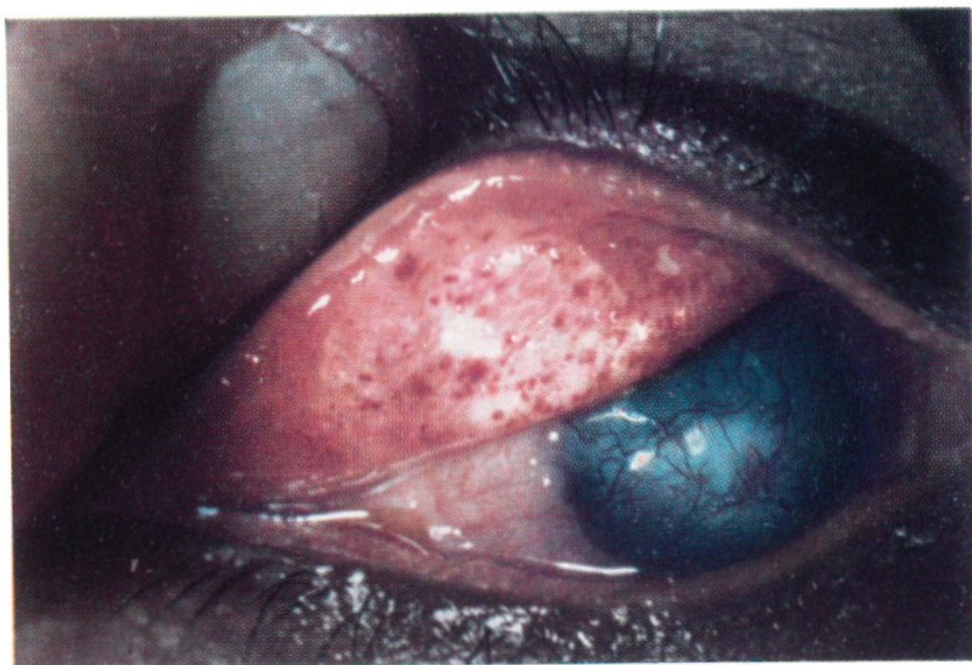


Fig. 6



Fig. 7

Figg. 6, 7. - Aspetti clinici della infezione tracomatosa sperimentale in volontari umani (vedi testo).

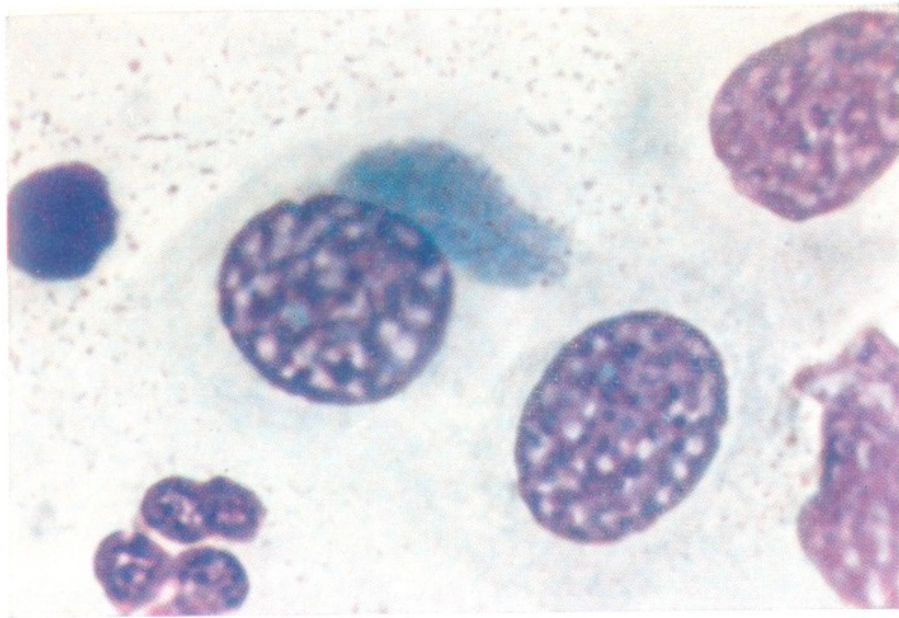


Fig. 8

Fig. 9

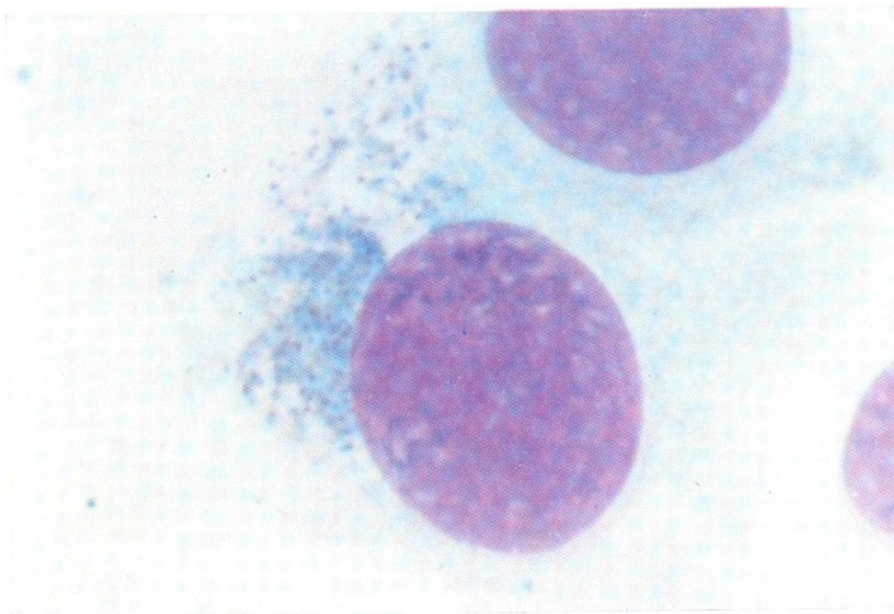
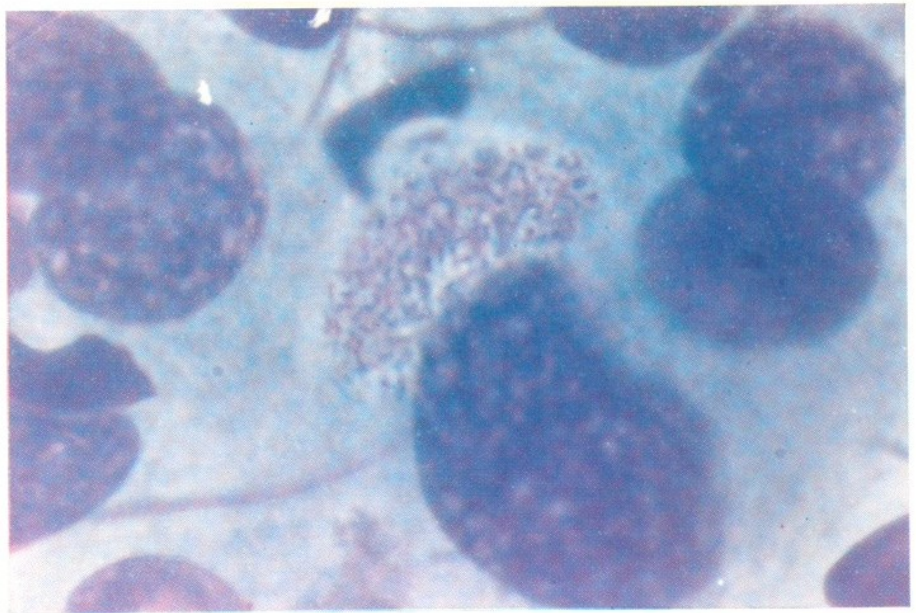


Fig. 10

Figg. 8, 9, 10. - Aspetti delle inclusioni citoplasmatiche nell'epitelio congiuntivale (col. Giemsa).

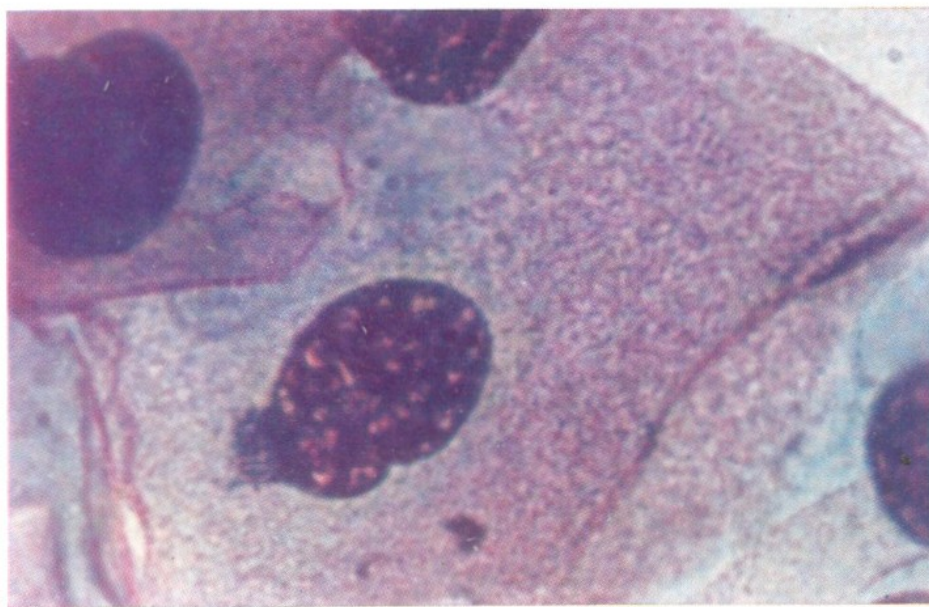


Fig. 11. - Inclusione citoplasmatica in fase iniziale in una cellula dell'epitelio corneale (col. Giemsa).



Fig. 12. - Biopsia congiuntivale. Abbondante infiltrazione sottoepiteliale.

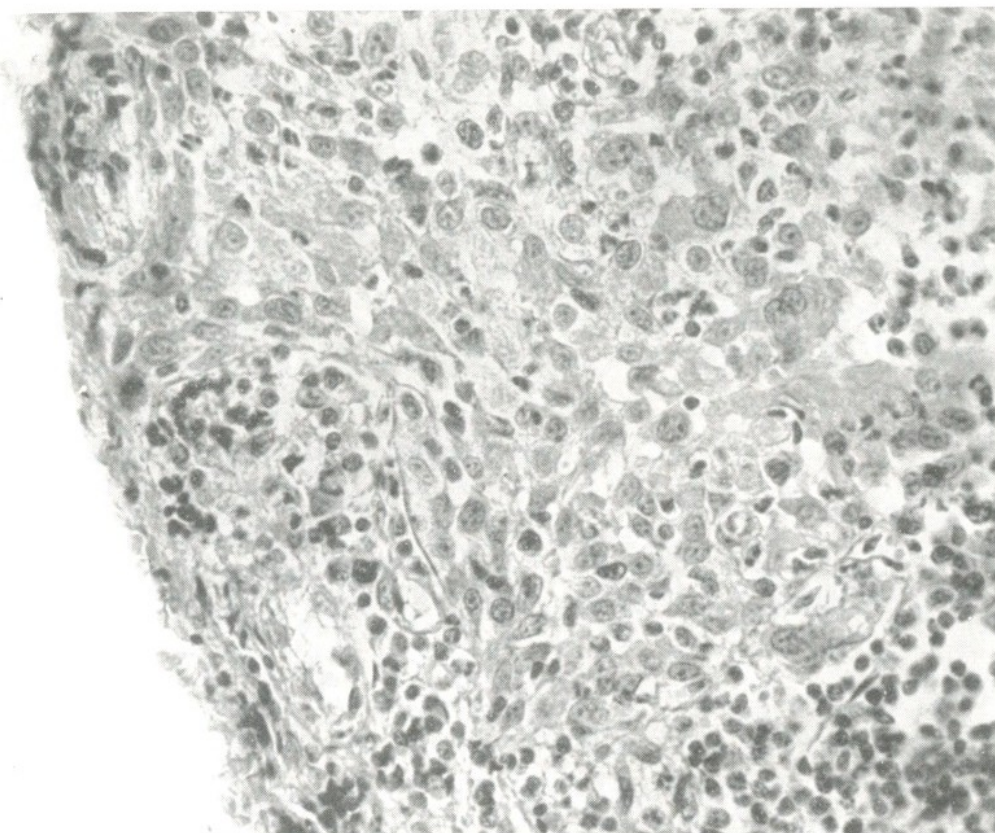


Fig. 13. - Biopsia congiuntivale. Proliferazione dell'epitelio congiuntivale con presenza di atipie cellulari.

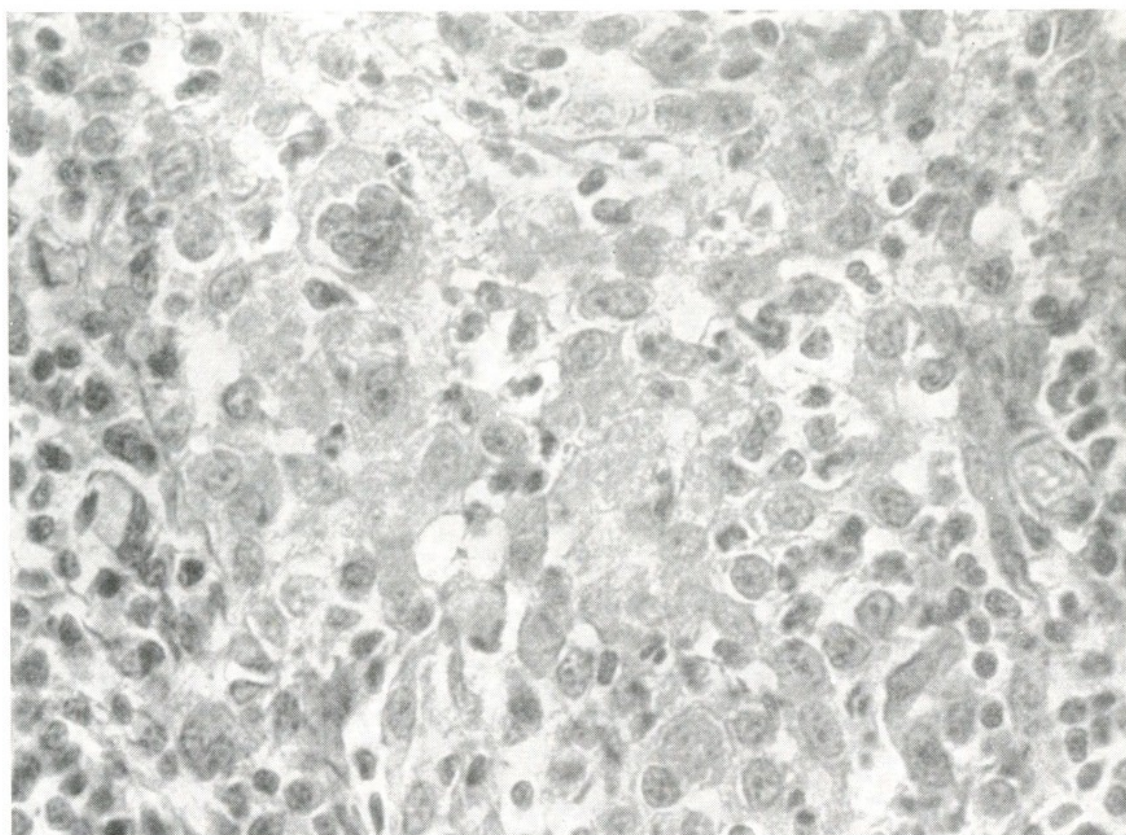


Fig. 14. - Biopsia congiuntivale. Atipie cellulari dell'epitelio. Cellule giganti plurinucleate.

mero, presentano un volume considerevole. (Figg. 2-3). Alcuni di essi sono localizzati sulla plica seminulare notevolmente edematosa (Fig. 1). Dopo colorazione con fluorescinato di sodio al 10%, sulla cornea si osserva, tra le ore XII e le ore II, una sottile area di disepitelizzazione limitata strettamente alla zona di passaggio tra congiuntiva ed epitelio corneale.

Il ganglio pretragico destro è notevolmente aumentato di volume e dolente.

Nulla di analogo si nota a carico dell'OS.

14^a giornata - Quadro simile al precedente.

17^a giornata - I già descritti disturbi soggettivi persistono con ugual intensità.

La secrezione, di colorito nettamente giallastro, è sempre notevole.

L'aspetto generale della congiuntiva palpebrale e bulbare è simile a quello della precedente osservazione. Numerosi follicoli sono presenti anche nel fornice inferiore.

La cornea si presenta superiormente di aspetto torbido ed opaco: sulla sua superficie, sino a 3-4 mm. dal limbus dall'alto in basso, sono visibili, dopo colorazione, delle piccole aree disepitelizzate ed infiltrate, di diametro da $\frac{1}{2}$ a 1 mm. (Figg. 4 e 5). Lo spessore corneale, in tutta l'estensione, è superiore che di norma.

Nulla di analogo a carico dell'OS.

21^a, 29^a, 40^a, 49^a 51^a giornata - Il quadro congiuntivale e corneale si conserva immutato.

CASO 04 - Individuo maschio di anni 15 affetto in OD da leucoma corneale stafilomatoso (visus spento) ed in OS da leucoma corneale paracentrale. Ha sofferto in passato di tracoma ed al momento dell'inoculazione presenta soltanto qualche modesta cicatrice congiuntivale.

Inoculato in OD il 19-6-1964.

Esame clinico. (Osservazioni eseguite alla lampada a fessura).

3^a giornata - Il soggetto si lamenta di sensazione di corpo estraneo e bruciore in OD. Presenta discreta secrezione giallastra puruloide nello stesso occhio.

La congiuntiva tarsale si presenta iperemica e chemotica con alcune petecchie sottocongiuntivali.

5^a giornata - Aumento dei disturbi oggettivi e soggettivi già descritti.

8^a giornata - Marcato edema ed iperemia della congiuntiva tarsale superiore ove persiste un discreto numero di petecchie (Fig. 6).

Ipertrofia papillare lieve e presenza di 2-3 piccoli follicoli grigio-giallastri nel settore temporale della congiuntiva tarsale superiore.

Il ganglio pretragico corrispondente non è tumefatto.

Nessuna alterazione a carico dell'OS.

14^a giornata - Il quadro a carico dell'OD si mantiene pressochè invariato.

17^a giornata - Persiste la secrezione congiuntivale con le stesse caratteristiche già descritte. Le petecchie sottocongiuntivali sono diminuite di numero e, le più grandi, di estensione.

L'ipertrofia papillare è più marcata e si estende anche al fornice inferiore. Il numero e la grandezza dei follicoli sono invariati.

Nulla a carico dell'OS.

21^a giornata - Il quadro è invariato.

24^a giornata - Persiste la secrezione congiuntivale ed i disturbi soggettivi sono sempre accusati.

Le petecchie sottocongiuntivali sono in via di scomparsa mentre l'edema congiuntivale sembra essersi diffuso coprendo anche la caruncola lagrimale e la plica semilunare. I follicoli sono in numero lievemente maggiore (4-5) e più rilevati sul piano congiuntivale.

Previa colorazione con fluorescinato di sodio al 10%, nella parte superiore della cornea ancora trasparente, è visibile una sottile striscia di disepitelizzazione, limitata all'epitelio di passaggio e compresa tra le ore 12 e le ore 2.

I vasi corneali che si portano dalla congiuntiva al leucoma corneale sono diventati turgidi e sinuosi.

29^a giornata - E' aumentata in estensione (dalle ore 10 alle 3) la zona di disepitelizzazione corneale, la quale è ora alta circa 3-4 mm.

Per il resto stesso reperto del precedente e nulla a carico dell'OS.

40^a giornata - Il quadro permane stazionario.

51^a giornata - Sono notevolmente diminuiti i disturbi precedentemente lamentati dal paziente; la secrezione è completamente scomparsa.

Sono del tutto scomparse anche le petecchie e permane solo un lieve edema ed una modesta iperemia dei vasi della congiuntiva e della cornea. L'ipertrofia papillare è tutt'ora evidente, mentre i follicoli hanno assunto un aspetto più appiattito e presentano una irregolarità (stellata) del loro contorno.

E' scomparsa la lesione dell'epitelio corneale precedentemente descritta.

CASO 05 - Individuo di 10 anni affetto in OD da leucoma corneale totale vascularizzato, l'OS. è normale. Ha solo qualche piccola cicatrice congiuntivale, molto probabilmente in rapporto ad un pregresso tracoma.

Inoculato in OD il 19-6-1961.

Esame clinico. (Osservazioni eseguite con lampada a fessura).

3^a giornata - Nulla a carico di OO.

5^a giornata - Lieve iperemia della congiuntiva palpebrale superiore nell'OD.

8^a giornata - Stesso quadro.

14^a giornata - E' insorta una lieve ipertrofia papillare a carico dell'OD.

17^a giornata - Alle alterazioni precedentemente descritte si è associato un lieve edema della congiuntiva della palpebra superiore e della caruncola lagrimale.

21^a giornata - Alcuni follicoli sono visibili all'angolo congiuntivale esterno superiore e 2-3 di essi sono situati sulla congiuntiva della plica semilunare notevolmente edematosa.

Il ganglio pretragico corrispondente non è palpabile e nulla è rilevabile a carico dell'OS.

24^a, 29^a, 40^a giornata - Quadro simile al precedente.

51^a giornata - L'edema e l'iperemia della congiuntiva sono notevolmente diminuiti.

I pochi follicoli presenti hanno un aspetto meno florido rispetto alle precedenti osservazioni e un contorno indistinto. L'ipertrofia delle papille è quasi scomparsa.

Nulla a carico dell'OS.

REAZIONE DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO.

In tutti i casi degli esperimenti n. 5, 6 e 7, è stato effettuato un sasso rispettivamente in 8^a e 40^a giornata dalla inoculazione. La reazione di fissazione del complemento eseguita con tali sieri ha dato in tutti i

casi, eccetto il caso n. 03, esp. 5, risultati negativi alla prima diluizione impiegata (1:4). Il caso n. 03 ha presentato l'evidenza di un movimento anticorpale nell'intervallo tra i due prelievi.

REAZIONE CUTANEA.

E' stata effettuata una sola volta, a 30 giorni dalla inoculazione, inoculando l'antigere sulla superficie flessoria dell'avambraccio. La lettura del risultato è stato effettuata a distanza di 24 h, valutando sia la presenza dell'eritema che la presenza ed entità della papula.

	E R I T E M A				P A P U L A			
	SAI	SA2	Asmara 3/61	Controllo	SAI	SA2	Asmara 3/61	Controllo
Caso 01	±	±	±	—	+	+	+	+
Caso 02	±	±	±	—	+	+	+	—
Caso 03	2	2	2	—	++	++	++	—
Caso 04	2	2	2	—	++	++	++	—
Caso 05	2	2	2	—	++	++	++	—

ISTOLOGIA.

L'esame istologico delle sezioni allestite sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina, Giemsa e Lugol, ha posto in evidenza quanto segue: l'epitelio congiuntivale appare irregolarmente stratificato essendo a tratti assottigliato, a tratti in fase di irregolare proliferazione, fig. 13.

Le cellule epiteliali dimostrano nelle zone proliferanti alterazioni strutturali rappresentate da picnosi e cariolisi. Si osserva anche la presenza di rare cellule giganti plurinucleate, fig. 14. Al di sotto dell'epitelio è presente uno strato di cellule infiammatorie, fittamente stipate, rappresentate da plasmacellule, granulociti neutrofili, linfociti e cellule istiocitarie. Le sezioni vasali sono dilatate e congeste e dimostrano talora infiltrati perivascolari, e piccoli stravasi emorragici.

I caratteri istopatologici suddescritti corrispondono a quelli di un processo infiammatorio congiuntivale cronico senza caratteristiche di specificità.

COMMENTO.

I. - Caratteristiche cliniche della infezione tracomatosa sperimentale.

a) Criteri secondo i quali è stata posta la diagnosi di infezione tracomatosa sperimentale.

Criterio A. Diagnosi di certezza: Questa è stata posta allorchè si è avuta: (1) l'evidenza clinica dell'infezione, la positività del reisolamento, la comparsa di inclusioni citoplasmatiche; (2) allorchè si è avuta l'evidenza clinica e la comparsa di inclusioni citoplasmatiche ed infine (3), eventualità presentatasi nella nostra esperienza nel caso dell'infezione sperimentale in soggetti vaccinati [caso n. 19, soggetto vaccinato con vaccino adsorbito su idrossido di alluminio (2)], allorchè si è avuta l'evidenza clinica e la positività del reisolamento.

Criterio B. Diagnosi con riserva: questa è stata posta allorchè, pur di fronte alla evidenza clinica di infezione, è mancata la possibilità di ottenere uno dei due dati di laboratorio citati.

b) Incidenza.

Su 27 caso della nostra casistica, un solo caso (n. 01, esp. 6°), si è dimostrato refrattario alla infezione sperimentale: ciò può essere affermato con certezza, in quanto un secondo soggetto, inoculato con lo stesso materiale, ha presentato una infezione sperimentale conclamata con tutti i segni, clinici e di laboratorio della malattia tracomatosa. Inoltre il numero delle DIU₅₀ contenute nell'inoculo adoperato (250) era tale che in base alla nostra esperienza, l'infezione tracomatosa avrebbe dovuto con tutta probabilità insorgere.

In un secondo caso n. 36 esp. 4°), facente parte di un gruppo di quattro soggetti inoculati con 0,25 DIU₅₀, la malattia sperimentale non è insorta ed è difficile stabilire, dato il numero ridotto delle DIU₅₀ impiegate, se ciò sia stato dovuto ad una refrattarietà del soggetto, od al fatto che l'inoculo adoperato conteneva una dose limite di corpuscoli elementari tracomatosi, capace di iniziare l'infezione.

Questa seconda ipotesi è, a nostro avviso, la più verosimile in quanto un secondo soggetto, dello stesso gruppo, non ha presentato con certezza la comparsa di inclusioni citoplasmatiche ed inoltre il numero di queste nei due soggetti dello stesso gruppo che le hanno presentate, è stato molto scarsa, relativamente al numero delle inclusioni citoplasmatiche riscontrate nei due gruppi di soggetti inoculati rispettivamente con 2,5 e 25 DIU₅₀.

Inoltre il caso n. 03 esperimento 7°, inoculato con un analogo numero di DIU₅₀, ha presentato una malattia sperimentale clinicamente e virologicamente di lieve entità.

Un commento a parte meritano a questo riguardo i casi dell'esperimento 3°.

L'inoculo impiegato in questo esperimento, contemporaneamente a numerose altre membrane impiegate nello stesso periodo di tempo non è riuscito a trasmettere l'infezione nelle uova inoculate o l'ha trasmessa, in ciascun esperimento, in una percentuale bassissima di uova.

In tale periodo di tempo si è avuta infatti la più bassa percentuale di infezione delle uova sinora registrata (Tavola 1; mese di settembre 1960). Riteniamo quindi che questo esperimento non possa essere messo a paragone di altri per giudicare i rapporti tra numero delle DIU₅₀ impiegate ed incidenza ed entità delle manifestazioni cliniche della infezione sperimentale. In questo esperimento infatti, pure impiegando un inoculo in cui non è stato possibile rilevare la presenza di corpuscoli elementari, ambedue i soggetti trattati hanno sviluppato una infezione tracomatosa conclamata.

In due casi (nn. 33 e 60 esp. 2), la diagnosi di infezione sperimentale è stata posta unicamente su base clinica.

c) Inizio ed evoluzione.

Non si può stabilire dall'esame dei casi osservati, l'epoca precisa in cui la malattia inizia. Nei primissimi giorni si osserva, nella maggioranza dei casi, un risentimento congiuntivale di tipo infiammatorio acuto da noi clinicamente definito « Congiuntivite acuta aspecifica », il cui probabile determinismo verrà discusso successivamente. Qui vogliamo sottolineare come in tali casi la presenza di follicoli non possa essere esclusa decisamente in quanto la loro visualizzazione può essere impedita dalla presenza di altre lesioni più imponenti.

L'osservazione dei primi elementi specifici della malattia (follicoli), è stata fatta in un'epoca variabile, dal momento della inoculazione, da 4 ai 21 giorni, per quanto, con maggiore prevalenza, alla fine della prima settimana.

La sede per la quale essi hanno dimostrato un predilezione nella loro prima comparsa è stata la congiuntiva della palpebra superiore. La loro evoluzione non ha mostrato particolarità degne di nota salvo che l'aumento di numero il quale sembra più rapido che nel tracoma naturale sebbene non costantemente.

Se nella maggioranza dei casi il decorso della malattia è stato acuto e le manifestazioni imponenti, pur tuttavia in una minoranza (casi 04 e

05) si è avuto un andamento molto lento, con inizio ritardato e le alterazioni osservate sono state lievi. In questi casi la malattia ha mostrato una tendenza spontanea alla regressione tanto che oltre i 40 gg. di osservazione era impossibile diagnosticare con certezza un tracoma in atto. Nelle osservazioni fatte dal punto di vista virologico abbiamo cercato di spiegare (caso n. 05) queste differenze che dal punto di visto clinico non trovano alcuna spiegazione.

E' da notare la mancata infezione del caso 01, esp. 5°, che sembra priva di qualsiasi giustificazione sia clinica che virologica.

Le lesioni corneali hanno assunto in un caso (03 esp. 5°) l'aspetto classico della « cheratite avascolare disseminata ». mentre in un'altro (04, esp. 6°) si è avuta una disepitelizzazione corneale semplice e limitata, che può essere verosimilmente interpretata come di origine meccanica.

d) Rapporto tra DIU_{50} impiegate e manifestazioni cliniche della infezione tracomatosa sperimentale.

Fatto eccezione del caso 01, esp. 5°, che si è dimostrato refrattario alla infezione sperimentale, vi è stata una correlazione fra numero delle DIU_{50} impiegate ed entità delle manifestazioni cliniche nel senso che dosi superiori a 25 DIU_{50} si sono dimostrate capaci di stabilire una infezione tracomatosa sperimentale conclamata. Alcune modeste differenze, osservate nella entità delle manifestazioni cliniche e soprattutto nel numero delle inclusioni citoplasmatiche nonchè nella possibilità di reisolamento del virus, sembrano piuttosto rispecchiare una diversa suscettibilità individuale essendo state osservate nell'ambito di ciascun gruppo che aveva subito il medesimo trattamento.

Impiegando un numero di DIU_{50} inferiore ad 1, è difficile stabilire con discreta verosimiglianza l'incidenza ed il decorso della infezione sperimentale. La nostra esperienza relativa a 5 casi ci ha dato un caso clinicamente e virologicamente non infettato, un caso clinicamente infettato ma privo di segni di laboratorio confermantì l'infezione, due casi clinicamente e virologicamente accertati (positivi per inclusi) ed in fine un caso clinicamente infettato positivo sia per la presenza di inclusi che per il reisolamento del virus. Quest'ultimo caso ha presentato una malattia a lenta insorgenza ed evoluzione con una certa discrepanza fra entità delle manifestazioni cliniche e reperto delle inclusioni citoplasmatiche da un lato e possibilità di reisolamento del virus dall'altro.

e) Rapporto tra numero dei passaggi in uovo dell'inoculo adoperato e patogenicità per la congiuntiva umana.

La patogenicità per la congiuntiva umana del ceppo di corpi elementari impiegati è rimasta pressochè invariata persino a 20 passaggi in uovo. Gli ultimi tre casi riportati in questa ricerca, assieme ad osservazioni recenti sulla lunghezza del periodo di incubazione, indicano chiaramente una attenuazione della virulenza per la congiuntiva umana del ceppo di corpuscoli elementari impiegato, per quanto il virus non abbia perso la sua patogenicità.

2. - Caratteristiche di laboratorio della infezione sperimentale.

a) Reisolamento del virus.

Prendendo in considerazione i soli casi in cui la diagnosi di infezione tracomatosa è stata stabilita con certezza, il reisolamento del virus è stato ottenuto nel 63% dei casi. Non vi è stato uno stretto rapporto tra possibilità di reisolamento e numero delle inclusioni citoplasmatiche presenti nel momento in cui il reisolamento è stato tentato. Infatti accanto a casi con un numero relativamente grande di inclusioni citoplasmatiche, risultati negativi (caso n. 44, esp. 4^o), vi sono stati casi come il n. 03 esp. 5^o, il 02 esp. 6^o e il 05, esp. 7^o che pur non avendo inclusioni dimostrabili sono stati positivi al reisolamento. In grande prevalenza il reisolamento è stato ottenuto al primo p.u.. La possibilità di reisolamento è rimasta invariata a cominciare dalla fine della prima settimana sino alla fine della settima settimana, dopo l'inoculazione.

b) Reperto delle inclusioni citoplasmatiche.

Il numero delle inclusioni citoplasmatiche riscontrato si è dimostrato in rapporto con l'entità della malattia presentata dal soggetto e, relativamente con il numero DIU₅₀ impiegate.

Negli individui inoculati con 80 o più DIU₅₀ il numero medio delle inclusioni è stato 9,5/30' in quelli inoculati invece con 25 o meno DIU₅₀, il numero medio delle inclusioni è stato di 3,50/30'.

Su 34 soggetti con follicoli il 73% ha presentato inclusioni citoplasmatiche mentre su 41 soggetti con segni di congiuntivite acuta aspecifica, il 60% è stato positivo per inclusi. A questo riguardo, come è già stato osservato (2), ci sembra degna di menzione la differente incidenza del reperto e del numero delle inclusioni citoplasmatiche, a parità di manifestazioni cliniche, tra infezione sperimentale e malattia naturale. In questo territorio infatti le inclusioni citoplasmatiche sono state messe in evidenza nel 10% dei soggetti con tracoma in fase attiva ed il loro numero medio è pari a 4.

Per quanto riguarda il numero delle inclusioni citoplasmatiche in rapporto alla evoluzione della malattia sperimentale, si può dire che esse

sono state presenti, per quanto in numero variabile per tutta la durata di essa a partire dalla fine della prima settimana.

Il caso n. 03, esp. 7° ha avuto, probabilmente in rapporto al numero limite delle DIU₅₀, impiegate, un comportamento diverso. Infatti pur di fronte alla positività del reisolamento le inclusioni citoplasmatiche sono mancate per tutto il periodo iniziale di osservazione per comparire ed apparentemente aumentare di numero verso il periodo finale dell'osservazione.

c) Inclusioni citoplasmatiche nell'epitelio corneale.

Questa ricerca, eseguita in 40^a gg. dalla inoculazione nel caso 03, esp. 5°, ha messo in evidenza 15 inclusioni citoplasmatiche in trenta minuti di osservazione microscopica.

d) Inclusioni citoplasmatiche nell'epitelio nasale.

Questa ricerca, eseguita nei casi 03 e 02, esp. 5° e 6°, in 29^a giornata dalla inoculazione, ha dato risultati dubbi. In rapporto alla natura secretoria dell'epitelio nasale, è stato infatti difficile differenziare le inclusioni da secrezione, dalle inclusioni specifiche. Comunque nessuna delle forme sospette osservate ha presentato caratteristiche morfologiche chiaramente distinte.

e) Isolamento del virus dal prelievo nasale.

L'isolamento del virus dal prelievo nasale è stato tentato in 29^a giornata dalla inoculazione in due casi (i medesimi riportati nel paragrafo precedente) che hanno presentato una forma clinica particolarmente evidente. In entrambi i casi l'isolamento è risultato positivo per quanto fosse contemporaneamente inquinato da schizomiceti.

Istologia: Il quadro istologico ha permesso di porre in evidenza alterazioni epiteliali con la produzione di atipie cellulari (cellule giganti) come si riscontrano in altri tipi di affezioni corneo congiuntivali (herpes simplex).

E' altresì interessante il fatto che i caratteri della infiammazione che pure datava da poco tempo erano quelli classicamente riferiti, per la presenza di un abbondante numero di plasma cellule, alle congiuntiviti di tipo cronico.

CONCLUSIONI.

1) Esiste una diversa suscettibilità individuale nel presentare l'infezione tracomatosa sperimentale, suscettibilità che va da una rara refrattarietà a modeste differenze nella entità delle manifestazioni cliniche e

nei reperti di laboratorio (possibilità di reisolamento del virus e numero delle inclusioni citoplasmatiche rilevabili). Si ignorano le cause di tale refrattarietà.

2) Inoculi contenenti dosi di virus inferiori ad 1 DIU₅₀ (0,25), sembrano contenere un numero di corpuscoli elementari limite capaci di iniziare l'infezione.

3) L'esistenza di modesti residui cicatriziali di una infezione tracomatosa pregressa non esclude la possibilità di una reinfezione.

4) L'infezione tracomatosa sperimentale colpisce sia la mucosa congiuntivale del fornice superiore che quella del fornice inferiore, nonché l'epitelio corneale.

5) L'infezione tracomatosa sperimentale si associa, nei primi giorni dopo l'inoculazione alla comparsa di una forma di congiuntivite clinicamente aspecifica nel cui determinismo pur potendosi ammettere l'importanza di probabili sovrapposizioni microbiche o di una componente allergica, riteniamo che il virus debba rivestire un valore decisivo, come dimostrato dalla positività, in tale fase, delle indagini virologiche.

6) La infezione tracomatosa sperimentale tende, nella maggioranza dei casi osservati, ad assumere inizio acuto, per quanto, in rapporto ad un numero limite di corpuscoli elementari, essa possa dimostrare una insorgenza lenta e graduale. E' stata così verificata l'ipotesi discussa da BIETTI ⁽⁶⁾, che l'acuzie del tracoma sperimentale, possa essere legata alla entità della carica virale impiegata come inoculum.

7) Dal raschiato nasale di casi con infezione sperimentale conclamata è stato possibile reisolare il virus per quanto non siano state osservate delle evidenti inclusioni citoplasmatiche nelle cellule dell'epitelio nasale. E' probabile pertanto che il reisolamento sia legato alla eliminazione di virus attraverso le vie lacrimali.

Asmara — Centro Oftalmico Hailé Sellassié I.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

Roma — Clinica Oculistica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- ⁽¹⁾ WHO - Rapport techniques, n. 406 (1956).
- ⁽²⁾ FELICI A. e VOZZA R. - Rend. Ist. sup. Sanità, 23: 1242 (1960).
- ⁽³⁾ VOZZA R. e FELICI A. - Hailé Sellassié Ist. Ophth. Center, Asmara Report, n. 2. March 1961.
- ⁽⁴⁾ BOVARNICK M. R., MILLER J. C. e SNYDER J. C. - J. Bacteriol. 59: 509 (1950).
- ⁽⁵⁾ FULTON F. e DUMBELL K. R. - J. gen. Microbiol., 3: 97 (1959).
- ⁽⁶⁾ BIETTI G. B. - Rev. int. Trach., 3: 273 (1958).