

Misc B76/38 58
PROF. FLAVIANO MAGRASSI



L'immunità acquisita nelle infezioni da ultravirus

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA" - VOL. VI, 1948

Esemplare fuori commercio per
la collezione agli effetti di
legge.

PROF. FLAVIANO MAGRASSI

L'immunità acquisita nelle infezioni da ultravirus

ESTRATTO DA "MEDICINA E BIOLOGIA", - VOL. VI, 1943

FLAVIANO MAGRASSI

L'IMMUNITÀ ACQUISITA NELLE INFEZIONI DA ULTRAVIRUS

LA sempre maggiore estensione che va assumendo il campo delle malattie infettive conosciute da ultravirus, i grandi progressi realizzati in questi ultimi anni anche negli studi riguardanti la natura di questi agenti infettivi, e i problemi di profondo interesse anche speculativo che questi ultimi hanno aperto, hanno contribuito ad accrescere il valore teorico e pratico delle ricerche dedicate all'immunità in queste infezioni.

Certamente legata alle particolari caratteristiche biologiche di questi agenti infettivi, tra cui è fondamentale lo stretto bioparasitismo, è la diffusa tendenza a voler attribuire all'immunità nelle infezioni da ultravirus una fisionomia più o meno unitaria, nettamente distinguibile dall'immunità acquisita verso altri agenti d'infezioni o tossine.

Contro questa tendenza Doerr [1] ha recentemente rivolto una lucida argomentazione critica: egli infatti ritiene che non esista nessuna forma d'immunità che possa considerarsi caratteristica per un unico gruppo di agenti d'infezione (batteri, spirochete, protozoi, ultravirus), in quanto le proprietà antigeniche e patogene di questi singoli gruppi di microbi, per quanto grandi differenze tra di loro presentino, non sono sufficienti a condizionare un loro particolare tipo di immunità acquisita. Il processo immunitario deve essere sempre considerato come una risultante delle caratteristiche dell'agente infettivo da un lato e dall'altro della reattività dell'orga-

nismo ospite, quest'ultima profondamente variabile, secondo la specie animale, la razza o l'individualità, quando pure non si voglia tener conto anche delle altre due grandi categorie di possibili ospiti di ultravirus, quali le piante ed i batteri.

Così, ad esempio, l'affermazione spesso ripetuta che l'immunità acquisita verso le infezioni da ultravirus si distingue per la solidità e per la sua lunga durata, non può essere in nessun modo estesa a tutte le infezioni da virus: alcune tra le più diffuse e le più studiate infezioni da virus, quali, ad esempio, l'influenza e il raffreddore, non lasciano che una instabile, variabile e transitoria immunità.

Pur non potendosi ritenere unico il tipo di immunità nelle infezioni da ultravirus, risulta però indubbio che lo studio dell'immunità da virus e per le diverse metodiche di ricerca di cui si vale e per determinate proprietà degli ultravirus si dimostrò particolarmente adatto alla risoluzione di problemi immunologici di grande importanza; ed appunto in funzione dell'ampio sviluppo che per queste ragioni esso presentò, viene ad assumere nel suo insieme una completezza e una profondità, che forse non sono state ancora raggiunte per nessuno degli altri gruppi di agenti di infezione.

Nella rapida sintesi che mi accingo a svolgere, non mi sono proposto di sviluppare, sia pure sommariamente, l'intero quadro dell'immunità da ultravirus (*); mi limiterò a sottolineare e a discutere alcuni dei problemi che mi appaiono di maggiore interesse, sopra tutto relativi al meccanismo con cui lo stato immunitario si determina: rappresenta infatti questo il punto centrale da cui si svolge e si chiarisce tutto il problema immunitario.

Il meccanismo dell'immunità acquisita può essere analizzato su tre direttrici di studio: 1° la ricerca delle proprietà *in vitro* e *in vivo*

(*) Rinvio, per una trattazione del problema immunitario nelle infezioni da ultravirus il più possibile completa anche dal punto di vista bibliografico (fino al 1939), al capitolo di HALLAUER e MAGRASSI, *Die erworbene Immunität gegen Virusinfektionen* in « Doerr u. Hallauer - Handbuch der Virusforschung », vol. II, pag. 1147, ed. Springer, 1939. Nel presente lavoro mi sono invece limitato solo a pochi accenni bibliografici, che hanno l'intento da un lato di completare in alcuni punti con i dati più recenti la trattazione sopracitata, dall'altro di inquadrare i contributi sperimentali apportati da me e dai miei collaboratori (Ciancarelli, Cipollone, De Gregori, Galli, Muratori, Scallì, Verrotti) allo studio dei diversi problemi immunitari nel campo degli ultravirus.

degli anticorpi antiviruses; 2° lo studio del destino del virus nell'organismo divenuto o in via di divenire immune; 3° la ricerca del mezzo o dei mezzi con cui può essere provocata artificialmente l'immunità.

Toccherò successivamente i diversi problemi, secondo lo schema sopracitato, cercando di risalire dal fenomeno particolare e più appariscente – formazione e significato dell'anticorpo antiviruses – all'esame più intimo del fenomeno immunitario nei suoi più complessi elementi determinanti.

I.

PROPRIETÀ DEGLI ANTICORPI VIRUS-NEUTRALIZZANTI.

In rapporto agli anticorpi virus-neutralizzanti presenti nel siero immune, due problemi fondamentali furono agitati e ripetutamente discussi con opposti orientamenti interpretativi: quello della reattività *in vitro* di questi anticorpi, e quello della loro attività nell'organismo animale o nelle culture di tessuti.

a) Reattività « *in vitro* » degli anticorpi virus-neutralizzanti.

La possibilità di dissociare con tecniche diverse (adsorbimento, cataforesi, ultracentrifugazione, iniezione della miscela in tessuti diversamente recettivi) le miscele preparate *in vitro* di siero immune e di virus, ed apparse neutralizzate alle prove nell'organismo animale, ha dimostrato la possibilità di ridare al virus in esse presente la sua primitiva azione patogena; questo fenomeno ha posto di nuovo in discussione, impegnando in una complessa revisione, il meccanismo d'azione *in vitro* degli anticorpi presenti nel siero immune, e chiamati con nomi diversi, che implicano anche diversi concetti, virulicidi, neutralizzanti, protettivi.

A priori il fenomeno di dissociazione qui ricordato presentava due possibilità interpretative: la dissociazione di una miscela virus-siero immune è possibile, perchè il legame stabilitosi *in vitro* tra virus ed anticorpi è reversibile, o perchè *in vitro* non interviene tra virus ed anticorpi nessun legame.

Un grandissimo numero di ricerche si rivolsero in questi ultimi anni alla risoluzione di questo problema: l'insieme dei risultati ottenuti porta decisamente alla conclusione, che il virus e gli anticorpi neutralizzanti presentano *in vitro* un determinato legame, in base al quale interviene una progressiva inattivazione del virus. I reperti sperimentali, su cui riposa questa ammissione, riguardarono in un primo tempo un ultravirus, il batteriofago, per il quale le difficoltà della tecnica sperimentale risultavano meno considerevoli; in seguito essi furono estesi anche ai virus animali. Tali reperti si possono così riassumere:

1° miscele subneutralizzate virus-immunsiero, che per un certo tempo sono ancora infettanti per determinati tessuti, perdono, prolungando la loro conservazione *in vitro*, la loro capacità infettante;

2° miscele di virus-siero immune neutralizzate o superneutralizzate, possono divenire di fronte alla diluizione o all'ultracentrifugazione solo incompletamente dissociabili od anche indissociabili, in funzione della concentrazione degli anticorpi nel siero immune e della durata della conservazione *in vitro* della miscela;

3° l'inattivazione del virus *in vitro* segue nei rapporti quantitativi la « legge percentuale » (*Percentage Law*) stabilita da Andrews e Elford [2] per il batteriofago e poi estesa da Merrill [3] al virus dell'encefalomielite equina (vedi avanti);

4° il contenuto in anticorpi di un siero immune può essere in modo sensibile diminuito dall'aggiunta di grandi quantità di virus.

È qui da ricordare che per i virus animali alcuni di questi dati poterono con precisione essere raccolti, solo quando Burnet [4] e collaboratori [5] estesero il loro metodo della dimostrazione quantitativa del virus sulla membrana corionallantoidea di uova di pollo allo studio delle miscele virus-siero immune; bisogna riconoscere che solo a mezzo di questa tecnica fu resa possibile una più completa e soddisfacente analisi della reazione virus-anticorpo. Sulla base dei risultati di Burnet e dei suoi collaboratori è consentita l'ammissione che determinati ultravirus si legano coi loro anticorpi neutralizzanti fondamentalmente secondo il tipo delle reazioni chimiche reversibili. Il processo della inattivazione del virus decorre apparentemente in due fasi: in una prima fase i componenti della reazione entrano in uno stato di equilibrio, che viene

raggiunto in un tempo più o meno rapido a seconda della concentrazione degli anticorpi; questo stato di equilibrio è caratterizzato dal fatto, che il rapporto percentuale tra le particelle di virus inattivate e quelle non inattivate (*Survivors*) è per una determinata concentrazione di siero sempre lo stesso, indipendentemente dalla concentrazione di virus presente nella miscela (*Percentage Law*); invece il valore percentuale delle particelle di virus non inattivate è inversamente proporzionale alla concentrazione del siero, cosicchè vale la regola: $C + P = \text{costante}$ (C = concentrazione degli anticorpi, P = percentuale delle particelle di virus non inattivate). Questa inattivazione del virus è nella prima fase della reazione ancora reversibile, potendosi dissociare l'anticorpo dal virus e quindi riattivare il virus. Il fatto già discusso da Andrewes e Elford [2] e da Merrill [3], che una determinata quantità percentuale di corpuscoli di virus sfugge all'azione degli anticorpi, viene spiegata da Burnet, Keogh e Lush [5] coll'ammissione che non tutti i corpuscoli di virus appartenenti ad una popolazione di virus presentano la stessa sensibilità verso l'immunsiero.

Questa prima fase reversibile dell'inattivazione del virus viene considerata da Burnet e collaboratori [4], [5] come quella veramente caratteristica.

La seconda fase, in cui non è più possibile una dissociazione tra virus ed anticorpi, rendendo quindi l'inattivazione del virus irreversibile, fu constatata dai diversi Autori, ma non fu meglio analizzata e approfondita.

In conclusione, il destino del virus, che subisce *in vitro* l'azione di un immunsiero, non si può considerare unitario; nelle miscele neutre o superneutralizzate, mentre una parte relativamente piccola di virus rimane completamente attiva, la maggior parte del virus, corrispondente a circa il 90-99 %, viene inattivata prima in modo reversibile, poi irreversibile. Da quanto è stato prima detto, non è invece ancora possibile precisare se il virus irreversibilmente inattivato abbia perduto definitivamente la sua capacità infettante, e cioè se si debba considerare veramente come ucciso. Il preciso significato della reazione *in vitro* tra virus e anticorpi virus-neutralizzanti rimane perciò sotto quest'ultimo punto di vista ancora in gran parte avvolta nel suo mistero.

b) *Meccanismo e limiti dell'attività protettiva esercitata dagli anticorpi virus-neutralizzanti sui tessuti viventi sottoposti a un'infezione da virus; immunità passiva locale e generale; sieroprofilassi e sieroterapia.*

Le conclusioni a cui sono giunto nei riguardi della reazione *in vitro* tra virus ed anticorpi consentono di interpretare l'attività protettiva di tali anticorpi sui tessuti viventi sottoposti a un'infezione da virus, nell'organismo animale o in cultura? È questo un punto di grande importanza, per la comprensione anche dell'intimo meccanismo del fenomeno immunitario.

È indubbio che l'anticorpo antivirale esercita — anche senza un preventivo contatto col virus *in vitro* — un'azione antiinfettiva *in vivo*; questa affermazione è provata dalle numerose ricerche sull'immunità passiva locale e sull'immunità passiva generale e dalle ricerche sulle culture *in vitro* di tessuti.

Annotiamo rapidamente alcuni dei fatti più salienti risultanti da queste ricerche.

Un'immunità completa verso dosi anche grandissime di virus può essere conferita ad un tessuto, quando esso sia direttamente trattato con una adatta quantità di immunsiero: questo « diretto trattamento » può essere ottenuto a mezzo della tecnica usata nell'immunità locale passiva o nelle culture di tessuti; in queste condizioni sperimentali infatti il tessuto vivente viene a trovarsi artificiosamente come immerso nel siero immune, così che intimo può subito divenire il contatto tra l'anticorpo e la cellula vivente.

A mezzo di queste due modalità di tecnica poté anche essere precisato il rapporto di tempo intercorrente tra il momento in cui il virus arriva all'elemento cellulare e il momento in cui ancora l'anticorpo riesce ad esercitare la sua azione protettiva; mentre tale azione protettiva viene ad essere completa, quando l'immunsiero arriva all'elemento cellulare contemporaneamente o prima del virus, essa è invece scarsa o nulla quando l'anticorpo arrivi al tessuto da qualche minuto a qualche ora (l'estensione di questo periodo di tempo è variabile in funzione del tipo di virus, della sua dose, del tessuto sul quale esso agisce) dopo che il virus è venuto con esso a contatto. Su questo punto che fu tanto largamente e tanto a torto sfruttato, come dimostrazione dell'inutilità della terapia serica ad infe-

zione avvenuta, ritornerò tra poco. Resta ad ogni modo provato da numerosissimi dati tutti concordanti il fatto sopracitato: la sua interpretazione ha dato luogo in genere all'ipotesi, che il virus, una volta localizzato nell'interno della cellula, sfugge all'influenza dell'anticorpo. Questa ammissione tuttavia non si può considerare sufficientemente dimostrata: gli stessi Rous, Mc Master e Hudak [6], i cui risultati sono stati largamente citati in appoggio ad essa, hanno interpretato i loro risultati con maggiore prudenza, nel modo seguente: « Essi provano soltanto che la protezione del virus (dall'anticorpo) è in qualche modo dipendente dalla vita della cellula. Il mantenimento di uno speciale stato alla superficie della cellula o in vicinanza di essa può essere sufficiente per questa protezione ». In realtà questi risultati sulla limitazione nel tempo dell'azione dell'immunsiero provano soltanto — in perfetta analogia del resto con quelli ottenuti con le tossine — che interviene rapidamente un così stretto legame tra virus ed elemento cellulare vivente, che un comune immunsiero non riesce più ad esercitare la sua influenza inattivante, mentre solo un siero iperimmune può riuscire ancora, in determinate condizioni, ad interrompere tale legame (l'importanza a questo riguardo della *forza* dell'immunsiero fu dimostrata in culture *in vitro* da Magill e Francis [7] per il virus influenzale). È sulla base di questo legame, ancora totalmente oscuro nella sua intima essenza, che il virus esercita sul protoplasma cellulare la sua azione a tendenza lesiva e « denaturante », la quale può, attraverso la moltiplicazione del virus, profondamente turbare l'equilibrio strutturale e funzionale del protoplasma vivente, così da portare alla manifestazione di malattia. Nelle condizioni sperimentali, del tutto artificiali, che abbiamo sopra esaminato (iniezioni locali di virus in un tessuto, o aggiunta di virus a un tessuto in cultura *in vitro*), l'arrivo del virus al tessuto avviene in modo e in quantità tale da rompere bruscamente l'equilibrio protoplasmatico: è solo in queste condizioni che valgono le sopracitate limitazioni nel tempo dell'attività degli anticorpi neutralizzanti che giungono nel tessuto dopo il virus. Seguendo altre modalità d'infezione, che più si avvicinano ai modi dell'infezione spontanea, si riesce a dimostrare che il legame tra virus e cellula vivente si può instaurare in modo da mantenere per un periodo di tempo limitato

o anche indeterminato un perfetto equilibrio tra elemento ospitante ed infettante, avendosi nell'un caso l'infezione latente corrispondente ad una parte del periodo di incubazione della malattia, nell'altro l'infezione latente vera e propria ad evoluzione ciclica o cronica: in mie ricerche [8] sono riuscito a dimostrare che l'equilibrio, il quale mantenendo il virus in uno stato quasi di simbiosi col protoplasma cellulare, ne neutralizza la tendenza lesiva e « denaturante », è sostenuto dall'evoluzione dell'immunità attiva, parallela a quella dell'infezione. Con una tecnica sperimentale, che sarebbe troppo lungo qui riferire in dettaglio, ho dimostrato la possibilità di interrompere a volontà tale equilibrio, mettendo la cellula in condizioni di inferiorità funzionale: viene così a riprodursi paradigmaticamente il passaggio dell'infezione dallo stato di latenza a quello di malattia, e quindi il passaggio dall'equilibrio simbiotico endocellulare alla rapida moltiplicazione del virus. Se in questa fase di transizione in cui il virus, trovandosi già legato alla cellula infettata da un tempo più o meno lungo (fino a qualche giorno), sta per prendere il sopravvento sui meccanismi attivi difensivi ed equilibratori messi in azione dal protoplasma cellulare, viene aggiunto in via passiva l'immunsiero, si ottiene il mantenimento dello stato di equilibrio tra cellula e virus, e cioè l'inibizione della moltiplicazione del virus, e la conservazione indefinita dello stato di latenza infettiva: si ottiene in altre parole lo scopo fondamentale di impedire l'instaurarsi dello stato di malattia. Il confronto tra i risultati precedentemente ottenuti da Autori diversi (vedi sopra) e quelli affiorati da queste mie esperienze, mi sembra d'importanza sostanziale per la comprensione dei rapporti intercorrenti tra i tre elementi della reazione-protoplasma cellulare, virus ed anticorpi. Attenendoci in parte a quella che oggi è l'interpretazione più accettata sulla natura del virus, si possono considerare nel virus a costituzione paucimolecolare e ad « organizzazione intramolecolare » (Stanley e Loring [9]) due funzioni distinte: una funzione inerte legata alla struttura chimica del virus, di cui sono diverse espressioni il « citotropismo » e l'attività antigenica; una funzione attiva a tipo fermentativo di cui è espressione la moltiplicazione del virus a spese del protoplasma cellulare, moltiplicazione a cui sono legate da una parte

L'attività lesiva del virus quando questo la possiede, e dall'altra la sua capacità diffusiva nell'organismo. Si può fondatamente supporre, e ne dirò più avanti dettagliatamente le ragioni, che un tessuto, qualsiasi esso sia, invaso dal virus reagisca immediatamente anche all'attività antigenica di quest'ultimo con la formazione di anticorpi: si stabilirebbe fin dall'inizio dell'infezione una specie di concorrenza tra i processi reattivi alla funzione chimico-antigenica del virus, che portano alla formazione dell'anticorpo, e i processi a tipo fermentativo del virus, che portano alla sua moltiplicazione, in funzione di una profonda modificazione « denaturante » di certi sistemi proteici della cellula infettata. Quando per particolari contingenze (dose del virus infettante e brusca e massiva invasione della cellula recettiva, condizioni di inferiorità funzionale della cellula stessa) si avvia il processo di denaturazione protoplasmatica, attraverso il quale si svolge la funzione a tipo fermentativo del virus, con neoformazione di nuovi « radicali » a funzione di virus, tale processo non può più venire arrestato dall'aggiunta passiva di anticorpi, che appunto su tale funzione prevalentemente dovrebbero interferire; in questo caso nella cellula invasa i fenomeni immunitari attivi di reazione alla funzione antigenica del virus vengono ad essere travolti e soffocati dalla soverchiante reazione a tipo fermentativo del virus stesso, che profondamente lede nelle sue funzioni vitali l'elemento cellulare. Invece ben diversamente si svolge il processo, quando fin dall'inizio l'anticorpo o preformato (passivo) o neoformato (attivo) riesce a mantenere quantitativamente la reazione di denaturazione protoplasmatica al di sotto del coefficiente lesivo per la cellula; solo in questo caso l'aggiunta di nuovi anticorpi trova le condizioni adatte a che abbia luogo l'azione inibitrice dell'anticorpo sulla funzione a tipo fermentativo del virus, impedendo così che questa a un determinato momento possa prevalere.

Questo insieme di fenomeni può essere forse più semplicemente tradotto in una rappresentazione schematica d'ordine chimico-fisico. Immaginiamo che il complesso molecolare proteina protoplasmatica + virus venga a rappresentare un sistema colloidale instabile; il cui equilibrio può venir mantenuto solo in presenza di un elemento protettore (anticorpo); se tale elemento protettore

viene aggiunto al sistema colloidale, quando già siano avviati, se pur non ancora apprezzabili, i fenomeni di flocculazione, esso risulta inefficace ad impedire l'ulteriore progressione della flocculazione, che anche in presenza dell'elemento protettore arriva sino alle sue massime conseguenze; quando invece l'aggiunta dell'elemento protettore interviene prima dell'inizio della modificazione di fase nel sistema colloidale (che potrebbe essere anche ritardato a mezzo di artefici determinati) viene mantenuto stabilmente l'equilibrio nel sistema stesso. Riportandoci alla cellula invasa dal virus, il ritardo nell'inizio della modificazione di fase nel sistema rappresentato dal protoplasma e dal virus, è provocato dall'intervento dell'anticorpo antivirale, espressione della diretta reazione della cellula di fronte all'entità chimico-antigenica del virus: questo ritardo, che può proiettarsi più o meno a lungo nel tempo, consente ad ogni modo l'ulteriore azione protettiva dell'anticorpo antivirale aggiunto in via passiva tardivamente, dopo l'inizio dell'infezione.

Sulla base di questo schema si può impostare anche il problema dell'efficacia della sieroprofilassi e della sieroterapia ad infezione avvenuta; dal punto di vista pratico non è naturalmente facile stabilire se il momento dell'intervento terapeutico rientra ancora in quel periodo di equilibrio iniziale cellula-virus, che si può ritenere presente in tutte le infezioni spontaneamente intervenute, e che ancora consente l'efficacia neutralizzante dell'immunsiero passivamente aggiunto; tuttavia mi pare che sarebbe errore grave assumere una posizione aprioristica di scetticismo, poichè anche a sintomatologia morbosa iniziata, bisogna sempre tener presente l'evoluzione a tappe per diffusione progressiva nei singoli tessuti o anche nello stesso tessuto dell'infezione da virus, così che è sempre possibile trovare un tessuto o una parte di tessuto in cui siano presenti quelle condizioni ottimali per l'azione dell'immunsiero, che abbiamo sopra enumerato; e in questo caso la riduzione, se non l'abolizione, di una parte delle manifestazioni di malattia, è da considerarsi un risultato più che sufficiente per giustificare il tentativo terapeutico. Naturalmente i risultati saranno tanto più manifesti, quanto più precoce è l'intervento del siero immune, e particolarmente quando questo cade nel periodo di incubazione, prima che si manifestino i sintomi prodromici della malattia.

È specialmente nelle infezioni da virus ad evoluzione essenzialmente setticemica che si riesce più chiaramente a dimostrare come il fattore rapidità, secondo il quale l'infezione decorre, e quindi anche la durata dell'incubazione, condizioni nettamente il momento in cui, dopo l'inizio dell'infezione, una protezione passiva può ancora essere ottenuta. Così, ad esempio, nel morbillo, la cui incubazione è di 9-11 giorni, l'iniezione di siero di convalescente è ancora efficace fino a 6-7 giorni dopo il contagio, cioè l'infezione manifesta viene - a seconda delle dosi di siero usate - o completamente inibita o chiaramente mitigata; invece nella peste aviaria a decorso travolgente (*exitus* del pollo dopo 24-36 ore dall'iniezione del virus) non si riesce più ad impedire l'esito letale già dopo 15-30 minuti dopo l'inizio dell'infezione anche a mezzo dell'iniezione endovenosa di grandi quantità di immunsiero (Hallauer) [11]. Ma anche nelle infezioni da virus strettamente neurotropi - come la rabbia e la poliomielite - per le quali, nei riguardi della sieroprofilassi e della sieroterapia, più diffusi appaiono lo scetticismo e la rassegnazione, esistono risultati, sia pure isolati, che testimoniano come in determinate condizioni l'iniezione di siero immune ad infezione avvenuta, riesca ad inibire lo svolgersi dell'infezione fino alla malattia, o per lo meno a rendere quest'ultima più mite. (Hallauer e Magrassi [12]).

Qualche altro dato interessante aggiungono le ricerche sull'immunità passiva generale; si può affermare riassuntivamente che i risultati qui ottenuti sono condizionati da due elementi agenti in senso opposto: la distribuzione del virus tra sangue e tessuti, e la distribuzione degli anticorpi tra sangue e tessuti.

È nelle infezioni a tipo setticemico che si riesce ad ottenere con maggiore facilità una soddisfacente immunità passiva generale, mentre nelle infezioni a più definito e stretto citotropismo, e particolarmente in quelle da virus neurotropi, meno intensa si dimostra l'efficacia dell'immunsiero. Per la stessa ragione l'immunsiero iniettato per via generale riesce ad influenzare scarsamente la lesione da diretta inoculazione di virus nel tessuto recettivo, mentre possono facilmente venire del tutto inibite e profondamente modificate le lesioni da diffusione secondaria del virus. Inoltre tutti i mezzi traumatici o farmacologici che concorrono ad aumentare la

permeabilità della parete vascolare verso i tessuti, chiaramente accentuano l'intensità dell'immunità passiva; altrettanto si può dire dei mezzi che modificano la barriera emato-encefalica, nel caso di infezioni da virus neurotropi, tenendo conto della difficoltà del passaggio di anticorpi dal sangue al tessuto nervoso, difficoltà che conferiscono nel campo immunitario al sistema nervoso centrale - in modo simile a quello che avviene per il tessuto corneale - una posizione a sè stante in confronto a tutti gli altri tessuti dell'organismo. Un chiaro paradigma della limitazione a cui soggiace l'azione dell'immunsiero nell'immunità passiva è fornito dai risultati ottenuti da Smorodintseff e Shishkina [13] nell'infezione da virus influenzale, che trova solo nei tessuti dell'apparato respiratorio il substrato tissutale ad esso squisitamente recettivo; da tali risultati infatti viene messo in evidenza che una diretta fissazione degli anticorpi serici da parte dei tessuti dell'albero respiratorio, quale si raggiunge solo attraverso la somministrazione per via respiratoria dell'immunsiero finemente disperso, si rende necessaria per ottenere in tale sede un solido stato immunitario, che invece può mancare del tutto anche in presenza di abbondanti anticorpi nel sangue circolante, quando l'immunsiero sia stato iniettato per altre vie.

L'importanza della presenza degli anticorpi a livello dei tessuti, in intimo contatto coll'elemento cellulare, indipendentemente dal contenuto in anticorpi del sangue, è dimostrato anche in modo brillante dalle ricerche sull'immunità congenitamente trasmessa. Potè infatti essere dimostrata negli animali congenitamente immuni una completa insensibilità, anche di fronte a quelle modalità di infezione - come l'iniezione di dosi massive di virus, la diretta infezione dei tessuti recettivi al virus, ed anche del sistema nervoso centrale - nelle quali gli organismi adulti immunizzati artificialmente in via passiva dimostrano sempre una relativa o completa sensibilità al virus. Si raggiunge così un elevatissimo grado di immunità passiva; comparabile soltanto per la sua intensità all'immunità attiva; perfino il sistema nervoso centrale si rivelò resistente alla diretta inoculazione intracerebrale di virus diversi, quali il virus rabbico (Konradi [14]), il virus dell'encefalomielite equina (Howitt [15]), il virus della peste aviaria (Hallauer [16]). Il

carattere decisamente passivo di questa immunità congenita è tuttavia definito dal fatto che gli animali già dopo alcune settimane o al più alcuni mesi divengono di nuovo completamente sensibili al virus: resta ad ogni modo accertato che anche la durata dell'immunità congenitamente trasmessa è assai maggiore di quella che si osserva nella comune immunità passiva. Si deve inoltre sottolineare che nei neonati altamente immuni, il contenuto in anticorpi antiviruses del sangue è per lo più molto scarso e talora perfino indimostrabile: anche in questi casi però la ricerca degli anticorpi nei tessuti risulta sempre abbondantemente positiva, e per periodi di tempi assai più lunghi che nell'animale adulto passivamente immunizzato (Hallauer [16]).

Non v'è quindi dubbio che durante la vita embrionale e fetale i tessuti dell'organismo possano venire progressivamente impregnati dagli anticorpi antiviruses trasmessi dagli umori della madre: e ciò anche quando nel sangue materno essi siano contenuti in quantità così piccole da non essere più dimostrabili coi nostri comuni mezzi di ricerca. Quello della trasmissione ereditaria dell'immunità può perciò essere considerato come il più sensibile metodo di ricerca degli anticorpi antiviruses materni: ed esso dimostra che anche nell'organismo materno tali anticorpi persistono, durante l'evolvere dell'immunità attiva, per un periodo di tempo assai più prolungato di quello che la loro ricerca nel sangue circolante della madre ce lo potrebbe far supporre.

Questo insieme di ricerche ci dimostra perciò che quando l'anticorpo antiviruses riesce, per particolari contingenze come quelle fornite dalla trasmissione dell'immunità dalla madre al feto, a venire in intimo e prolungato contatto coi tessuti dell'organismo, esso è capace di conferire a questi uno stato di resistenza verso il virus altrettanto solido di quello che si può ottenere attraverso i processi dell'immunità attiva. Questo importante dato di fatto dovrà essere da noi tenuto presente anche nell'interpretazione del meccanismo di quest'ultima.

La necessità di questo intimo rapporto tra elemento cellulare ed anticorpo antiviruses, affinché quest'ultimo possa esercitare la sua azione protettiva sul tessuto, è stato da qualche Autore interpretata come espressione di un diretto legame tra cellule ed anticorpo

indipendentemente dalla presenza del virus nel tessuto: tra i più autorevoli, Sabin [17] facendo leva sul fatto ripetutamente constatato che la stessa miscela di virus-siero immune può essere non infettante se iniettata in un tessuto recettivo al virus, ed infettante se iniettata in altro tessuto (tra i tessuti più adatti a mettere in evidenza questo fenomeno di dissociazione sono da ricordare il cervello e il testicolo), parla di un « bisogno di anticorpi » che sarebbe diverso nei diversi tessuti; e ciò nel senso che, mentre un tessuto potrebbe essere protetto verso un'infezione da una determinata quantità di anticorpi, un altro abbisognerebbe per difendersi dalla stessa quantità di virus di una quantità maggiore dello stesso immunsiero. Deve tuttavia essere sottolineato che questa concezione di Sabin [16] implica l'ammissione, che l'azione dell'anticorpo si espliciti non sul virus, ma soltanto sul tessuto, e cioè che il tessuto caricato di anticorpi si debba considerare già difeso prima dell'inizio dell'infezione.

Ora che il tessuto messo a contatto col siero immune sia capace di fissare una certa quantità di anticorpi, indipendentemente dalla presenza in esso del virus, fu dimostrato da esperienze di Sabin [18], che io [18] ho potuto confermare ed estendere, mettendo anche in evidenza però che nessuna differenza esiste tra tessuto e tessuto di uno stesso organismo per ciò che riguarda tale capacità di assorbimento: questi dati di fatto non sono tuttavia sufficienti ad escludere, come Sabin [17] vorrebbe, il virus dal meccanismo d'azione dell'anticorpo difensivo, riportando tutto in tale meccanismo al diretto rapporto dell'anticorpo con la cellula.

Infatti, anche il diverso comportamento di tessuti diversi di fronte ad una stessa miscela di virus-siero immune può essere equiparato a quei fenomeni di dissociazione *in vitro* tra virus ed anticorpi, sui quali già abbiamo discusso. Ci potremmo cioè trovare anche qui di fronte alla fase reversibile della reazione tra virus ed anticorpo; ed a determinare la diversa possibilità di dissociazione tra i due elementi della reazione, nei diversi tessuti, possono concorrere, da un lato la velocità di diffusione e di eliminazione dell'anticorpo dalla sede di iniezione, che evidentemente dipende dalla struttura del tessuto, dall'altro l'intensità e la velocità del legame che si stabilisce tra il virus invasore ed il protoplasma cellulare, e

che naturalmente è anch'esso soprattutto funzione di quest'ultimo. D'altro lato nessuno dei dati di fatto che ho sin qui esposti si oppone all'ammissione che la reazione *in vivo* tra virus ed anticorpi sia dello stesso tipo di quella che abbiamo visto avvenire *in vitro*. Tuttavia, anche accettando quest'ultima interpretazione, che sulla scorta dei fatti pare veramente la più plausibile, non viene ugualmente risolto il nucleo fondamentale del problema: come avviene che il virus unito all'anticorpo, sia pure da un legame labile e reversibile, perde la sua capacità lesiva sull'elemento cellulare? Numerose ipotesi furono a questo proposito emesse; tutto quanto è stato detto sulla possibilità di riottenere virus attivo da miscele dimostratesi non infettanti *in vivo*, elimina a parer mio l'interpretazione di un'azione virulicida dell'anticorpo, azione virulicida che tuttavia è ancora accettata anche da Autori recenti (v. Goyal [19]); successivamente fu ammesso, tra i primi da Andrewes [20], che l'azione dell'immunsiero consistesse in un impedimento, sconosciuto nella sua essenza, all'entrata del virus nelle cellule. Quest'ultima interpretazione fu seguita in questi ultimi anni dalla grande maggioranza degli Autori: essa tuttavia non mi pare possa più venire oggi accettata. Infatti ricerche mie [21], condotte in collaborazione con Hallauer, e ricerche di Sabin [18] hanno dimostrato che in culture *in vitro* il virus si fissa all'elemento cellulare in presenza dell'immunsiero come in presenza del siero normale; è questo un dato di grande importanza, poichè ci impone di ammettere che il legame stabilitosi tra virus ed anticorpo non impedisce al virus di « infettare » il protoplasma cellulare. Ho adoperato qui il verbo « infettare » in un senso un po' diverso dal consueto, intendendo per esso lo stabilirsi di un legame tra elemento-virus ed elemento-cellula. È certo che il rapporto tra virus e cellula, in funzione di questo legame, viene ad essere diverso a seconda che sia presente o non l'anticorpo, in quanto si può andare per gradi dalla rapida e facile moltiplicazione del virus, quale si ha in assenza dell'anticorpo, alla scarsa o nulla moltiplicazione, fino alla più o meno rapida indimostrabilità del virus, quale si ha in presenza dell'anticorpo.

Ma in che cosa consista in realtà questa differenza, non è ancora possibile precisare. È solo possibile affermare che nel determinismo

di essa il protoplasma cellulare, invaso dal virus, non si comporta come un substrato passivo bensì ad essa attivamente concorre, come è dimostrato dal fatto che mantenendo costanti due elementi della reazione, e cioè dose di virus e quantità di immunsiero e facendo variare il substrato tissurale in cultura *in vitro*, si ottengono risultati profondamente diversi (Magrassi e Hallauer [21]). Si può qui richiamare, quanto già è stato accennato a proposito della duplice funzione, di tipo chimico e di tipo fermentativo, esercitata dal virus di fronte al protoplasma cellulare: è su questo ultimo che probabilmente interferisce l'anticorpo nella sua azione protettiva verso l'elemento cellulare; e ciò rende comprensibile come possa dall'anticorpo venir modificato in senso inibitorio il risultato di tale azione fermentativa attraverso una modificazione dell'anello che pone di fronte il virus, nella sua attività «denaturante» di alcuni sistemi proteici protoplasmatici, e il substrato protoplasmatico, nella sua vivente individualità cellulare. In conclusione la neutralizzazione del virus da parte dell'anticorpo si risolve, di fronte all'elemento cellulare, in un'azione inibente sullo sviluppo e sulla moltiplicazione del virus nella cellula stessa.

c) Sede di produzione degli anticorpi virus-neutralizzanti.

Un ultimo punto, che nello studio delle caratteristiche dell'anticorpo antivirale, è necessario toccare, è quello della sede di produzione di tali anticorpi. Ho già accennato alle necessità di distinguere nel virus, nei suoi rapporti colla cellula, una funzione antigenica ed una funzione infettante: ciò implica già una netta presa di posizione nei riguardi dell'origine cellulare degli anticorpi, nè credo necessario di porre in discussione questa affermazione. Tuttavia dalle ricerche condotte in questo campo si possono trarre alcune conclusioni di notevole interesse, che è opportuno sottolineare: 1° i tessuti infettati dal virus possono reagire con meravigliosa rapidità (entro 24-48 h.) con la produzione di anticorpi neutralizzanti; all'inizio dell'immunità, prima della comparsa degli anticorpi nel sangue, il contenuto in anticorpi dei singoli organi o tessuti può essere diverso, in quanto la formazione degli anticorpi in tali tessuti segue chiaramente le tappe della diffusione del

virus (Vieuchange e Galli [22]); 2° da ciò consegue che alla produzione degli anticorpi sono deputati non soltanto i centri veri e propri del S.R.I. (fegato, milza, midollo osseo), ma anche gli altri tessuti dell'organismo che vengono invasi dal virus (ad esempio, pelle, testicolo, cervello); 3° che anche il virus che ha perduto la sua capacità infettante, come si ottiene, ad esempio, a mezzo della formolizzazione, mantiene intatta la sua capacità antigenica, testimoniata dalla possibilità di ottenere con essa un'abbondante produzione di anticorpi umorali. In ciò che è stato detto sopra è implicita l'affermazione che le cellule del S.R.I. si comportino di fronte all'antigene-virus così come di fronte agli altri antigeni, e cioè si debbano considerare come dotate elettivamente della funzione formatrice degli anticorpi. Ma per i virus è da porre in discussione se in questa funzione intervengano solo le cellule di questa categoria che sappiamo presenti, sia pure in numero diverso nei più diversi tessuti, od anche le cellule specificamente recettive al virus, da questo invase. Pur mancando degli argomenti diretti, esistono tuttavia numerose prove indirette, che risultano particolarmente dallo studio della dinamica del processo infettivo, sul quale tra poco ritornerò, atte a venire in appoggio all'ipotesi che tutte le cellule, nel cui protoplasma il virus in qualche modo si fissa, siano capaci di reagire alla funzione chimico-antigenica di questo con la formazione di anticorpi specifici.

Si può forse immaginare tutta una scala di cellule, a caratteristiche intermedie tra i due estremi rappresentati da un lato dalle cellule a massima differenziazione, a massima affinità elettiva specifica per determinati virus e a scarsa capacità reattiva-immunitaria - tipo la cellula nervosa per i virus neurotropi -, e dall'altro dalle cellule a minima differenziazione, a generica e scarsa affinità per tutti i virus, e ad elevata capacità reattiva-immunitaria - tipo le cellule del S.R.I.; sarebbe quest'ultima categoria di cellule la sola, che interverrebbe nei processi immunitari, reattivi a virus che abbiano perduto la capacità infettante, conservando solo la funzione antigenica, in quanto esse sono le sole che siano capaci di fissare il virus attivamente attraverso la funzione fagocitaria. Si arriverebbe così ad ammettere che quando il virus invade un tessuto o un organo, tutte le cellule che lo costituiscono entrino in

azione, a seconda delle loro diverse possibilità, e reciprocamente si influenzano condizionando da un lato l'evoluzione del processo infettivo, e dall'altro lo sviluppo ad esso parallelo e contemporaneo dei fenomeni immunitari: risulterebbe in tal modo comprensibile, nei suoi diversi aspetti e nelle sue possibili combinazioni, la dinamica dell'infezione e dell'immunità attiva, parallelamente a quella svolgentesi. È quest'ultima appunto che ora bisogna accingersi ad analizzare.

II.

L'IMMUNITÀ DA INFEZIONE: DESTINO DEL VIRUS NELL'ORGANISMO IN VIA DI DIVENIRE O DIVENUTO IMMUNE.

È stata prima presa in considerazione una delle risultanze del fenomeno immunitario, l'anticorpo antiviral; ne sono state analizzate le diverse caratteristiche, e si è cercato soprattutto di mettere in evidenza il meccanismo della sua azione protettiva: già da quanto è stato detto risulta perciò in parte documentata la grande importanza di questo fattore nel determinismo dello stato immunitario. È ora necessario percorrere il cammino in senso inverso, per poter analizzare il fenomeno immunitario nelle successive fasi della sua evoluzione, e poter così precisare la parte che in realtà vi prende l'anticorpo antiviral.

Il destino del virus nell'organismo in via di divenire o già divenuto immune rappresenta l'indice più importante nello studio del meccanismo dell'immunità attiva: ed è appunto questa traccia che ora seguiremo.

a) *Dinamica del processo infettivo nello svolgersi successivo delle sue fasi.*

L'indissolubile rapporto tra l'evoluzione del processo infettivo e quello dei fenomeni immunitari ad esso legati ci obbliga innanzi tutto a prendere in esame la dinamica del processo infettivo nei suoi diversi possibili sviluppi, e quindi il successivo evolvere del rapporto tra cellula e virus.

Levaditi e Nicolau [23] hanno per primi parlato della necessità di distinguere altrettante immunità parziali quanti sono i tessuti

sensibili, intendendo riportare il meccanismo di tali immunità parziali, nelle quali l'immunità generale si decompone, ad un fattore squisitamente cellulare, del tutto indipendente dall'azione microbica degli umori. Ma questi Autori hanno trascurato, nello studio di queste immunità parziali, il comportamento del rapporto tra il virus della prima infezione e il tessuto o la cellula che lo ospita: invece è proprio quest'ultimo che condiziona l'insorgenza dell'immunità; quindi solo lo studio di esso permette la comprensione del meccanismo con cui l'immunità stessa interviene.

Fu appunto questo l'orientamento che guidò gran parte delle ricerche mie e dei miei collaboratori, orientamento basato essenzialmente sul concetto che l'infezione dell'organismo si può considerare risolta in multiple infezioni distinte aventi sede nei diversi tessuti nei quali il virus si è fissato. I risultati ottenuti da queste ricerche (Magrassi [8], [24], [25], [26]; Magrassi e De Gregori [27]; Galli [28]), che non posso naturalmente qui esporre in dettaglio, mi confermarono che la chiave del meccanismo dell'immunità nelle infezioni da virus risiede appunto nel rapporto che si stabilisce tra l'elemento cellulare e il virus, sia esso di prima infezione o di successiva infezione di prova.

Secondo questi risultati, che, se pur ricavati solo dallo studio di due infezioni tipiche da virus quali la vaccinica e l'erpetica, trovano nelle integrazioni e nei completamenti forniti dalla letteratura relativa ad altre infezioni da diversi ultravirus, la possibilità di una relativa generalizzazione, la dinamica del processo infettivo può essere così schematicamente ricostruita.

Quando un tessuto è invaso dal virus vi si stabilisce in una prima fase un'infezione latente, rappresentata da un relativo equilibrio tra cellula e virus, per cui viene limitata la moltiplicazione del virus al di sotto dalla soglia patogena, e quindi vengono a mancare in tale periodo i perturbamenti funzionali e anatomici del tessuto, che si manifesteranno poi attraverso la malattia.

A determinare e a mantenere tale infezione latente, che si potrebbe chiamare « di incubazione » o « presintomatica », entra quale elemento equilibratore, fin dalle primissime fasi del processo che lega il virus alla cellula, l'anticorpo antivirale. Appunto la precocità con cui tale anticorpo compare nel tessuto invaso dal virus,

in quanto a questo recettivo e indipendentemente dalla struttura del tessuto stesso, costituisce l'argomento fondamentale, sia pure indiretto, per far ammettere la diretta produzione dell'anticorpo antivirale da parte della cellula infettata.

Questa prima fase d'« infezione latente d'incubazione » può presentarsi ed evolvere in modo diverso a seconda delle risultanti del reciproco influenzarsi di vari elementi: virulenza del virus (che risulta dalla velocità di moltiplicazione e dall'attività tossico-lesiva sul protoplasma cellulare), quantità e dose dello stesso, capacità reattiva della cellula. Infatti tale infezione latente può essere di brevissima durata, fino a divenire praticamente nulla, quando il virus è inoculato in dose elevata direttamente nel tessuto recettivo; essa assume invece in genere una maggiore evidenza quando il virus si diffonde nel tessuto per spontanea migrazione dal primitivo focolaio d'infezione. In questa prima fase il legame tra virus ed anticorpo è reversibile: si può infatti passare da questa prima fase d'infezione latente d'incubazione alla fase dell'infezione manifesta, e quindi della malattia, o per un prevalere spontaneo dell'attività moltiplicativa del virus sulla capacità difensiva della cellula, e quindi sull'attività equilibratrice dell'anticorpo che ne è l'espressione, o artificialmente provocando una deficienza funzionale della cellula, che permette, divenendo inefficace la sua reazione immunitaria, il prevalere dell'attività moltiplicativa del virus. Questa seconda evenienza, da me [8] dimostrata nell'infezione da virus vaccinico attraverso una particolare metodica sperimentale (trasporto in cultura *in vitro* di tessuti prelevati dall'organismo in fasi diverse dell'infezione latente), ha una notevole importanza: infatti essa si rivela possibile solo quando le condizioni d'inferiorità funzionale imposte alla cellula intervengono nel periodo in cui il legame tra virus ed anticorpo è ancora nella cellula stessa reversibile. Questa prima fase di infezione latente può passare nell'infezione manifesta, o può permanere allo stato di latenza: nel primo caso si raggiunge il massimo di concentrazione del virus nel tessuto, nel secondo si trasformano le caratteristiche del rapporto tra cellula e virus, in quanto il legame di quest'ultimo coll'anticorpo è divenuto, di fronte alla cellula che è sede della reazione, irreversibile; in questo caso la cellula, in cui la

reazione tra virus ed anticorpo ha subito questa nuova evoluzione, non consente più la moltiplicazione del virus, anche se posta in quelle stesse condizioni di inferiorità funzionale che, nella fase precedente, tale moltiplicazione permettevano. Si ha qui un'altra prova di quale essenziale importanza assuma la partecipazione dell'elemento protoplasmatico cellulare al determinismo del risultato della reazione tra virus ed anticorpo; infatti la irreversibilità della reazione che si manifesta attraverso la stabile inibizione alla moltiplicazione del virus nella cellula che della reazione è sede, è condizionata in questa fase dal mantenersi della reazione stessa nella cellula in cui essa ha avuto inizio; è sufficiente infatti il passaggio del virus qui presente nel tessuto recettivo di un organismo nuovo per ottenere ancora un'evidente moltiplicazione del virus. Ciò porta evidentemente a distinguere nella reazione tra virus ed anticorpo una irreversibilità relativa alla sede endocellulare della reazione stessa, dalla irreversibilità assoluta quale abbiamo già visto avvenire nella reazione *in vitro*, e quale si può avere, come vedremo tra poco, anche *in vivo* in una fase più tardiva.

Una condizione opposta a quella sopracitata, in cui, come ho detto, un'infezione latente, che lasciata a sè si sarebbe ulteriormente svolta allo stato di latenza, fu, a mezzo di un artificio sperimentale, trasformata in infezione manifesta, fu pure da me [26] realizzata in altre esperienze condotte col virus erpetico: un'infezione che lasciata a sè sarebbe passata dalla fase di « infezione latente d'incubazione » alla fase di infezione manifesta, e cioè alla fase di malattia (rappresentata dalla gravissima encefalite erpetica del coniglio), potè essere artificialmente influenzata dall'iniezione di virus attivo o formolizzato eseguita tempestivamente nel tessuto (cervello) sede dell'infezione latente, così da ottenersi l'inibizione del passaggio alla fase di attiva moltiplicazione di virus, a cui consegue l'affiorare della sintomatologia clinica encefalitica. Si ottenne cioè in questo caso, a mezzo di un artificio sperimentale, atto ad esaltare la reazione immunitaria cellulare, il diretto passaggio dalla fase di « infezione latente d'incubazione » a uno stato di più durevole infezione latente sconfinante nella fase di cosiddetta autosterilizzazione, senza passare attraverso lo stato di malattia, che sarebbe stato inevitabile lasciando all'infezione il suo normale

decorso. Questo fenomeno fu chiamato « fenomeno di Magrassi » da Doerr e Seidenberg [29] che ne ripresero successivamente lo studio confermandolo ed estendendolo, e trovò in esperienze di Ciancarelli [30] la sua dimostrazione anche in altra specie animale (*Mus musculus*) oltre che nel coniglio, nel quale era stato inizialmente messo in evidenza. L'influenzamento antagonistico esercitato dalla reinoculazione di virus, eseguita in tempo e in sede opportuni, sul decorso e sugli esiti del processo infettivo già in atto, dimostra attraverso una nuova via quale importanza abbia il fattore immunitario cellulare, nel determinismo della particolare fisionomia che vengono ad assumere le diverse fasi del processo infettivo nel loro successivo evolvere.

Questo insieme di ricerche mette perciò in chiara evidenza quali sono i limiti, entro i quali può svolgersi la seconda fase del processo infettivo, sulla quale ci siamo qui soffermati; essa infatti oscilla tra queste due possibilità: infezione manifesta, che risulta dall'intensa moltiplicazione del virus fino a superare la soglia patogena, e infezione latente, che in opposizione a quella « di incubazione » si potrebbe chiamare di « stabilizzazione », e che è definita dal mantenersi dell'equilibrio cellula-virus attraverso la progressione irreversibile della reazione endocellulare virus-anticorpo. Queste stesse ricerche dimostrano inoltre che fissati i diversi fattori che entrano nel processo infettivo, e cioè il virus, la modalità d'infezione e il substrato tissutale, l'affioramento di un'infezione manifesta o di un'infezione latente dipende esclusivamente dal gioco che nel processo infettivo sostiene il fattore immunitario cellulare, di cui è fondamentale espressione l'anticorpo antivirale; tale gioco può essere influenzato con opportuni artifici sperimentali, così da ottenersi da esso risultati opposti. Deve essere però sottolineato che quando vengono invece a variare gli altri fattori che partecipano al processo infettivo, quali il virus o l'organismo ospite, l'evolvere dell'infezione allo stato di latenza o di malattia manifesta viene condizionato da diversi fattori variabili, di cui soltanto pochi sono stati finora precisati e chiariti nella loro essenza: ricorderò, a titolo di esempio, da un lato le possibili variazioni che si hanno da ceppo a ceppo, nell'ambito di un tipo di virus, in funzione delle intrinseche caratteristiche del ceppo di

virus usato (come, ad esempio, per il virus erpetico il diverso comportamento dimostrato in mie ricerche [25], [26] confermate successivamente da Doerr e Hallauer [31], dei ceppi « encefalitogeni » e « non encefalitogeni », nel loro sviluppo nel tessuto nervoso di coniglio), e dall'altro le variazioni che si hanno per uno stesso virus, in funzione della recettività dell'organismo ospite (risultante da diversi fattori variabili, quali la specie animale, l'età ecc.), della via di infezione e della quantità di virus iniettato.

Dalla seconda fase – sia essa rappresentata dall'infezione manifesta o dall'infezione latente di stabilizzazione – si passa alla terza fase, che si può chiamare di « infezione latente terminale ». È questa identificabile con quella che fu impropriamente chiamata di « autosterilizzazione »: il virus non solo si dimostra incapace di moltiplicazione nella cellula infettata, ma anche diviene in essa irriconoscibile a mezzo dei comuni metodi di dimostrazione; solo ricorrendo a quelle stesse tecniche, che abbiamo visto essere atte a determinare il fenomeno di dissociazione delle miscele virus-siero immune – *in vitro* o *in vivo* – si riesce in un primo tempo a dimostrare la presenza del virus nella cellula. In una fase ulteriore anche queste tecniche di dissociazione divengono incapaci di dimostrare il virus nella cellula: corrisponde questa alla fase di inattivazione irreversibile, che già fu dimostrata *in vitro* nella reazione tra virus ed anticorpi, e per la quale difficile è precisare il reale destino del virus. Resta così fissato da un lato che l'infezione evolve nei singoli tessuti con relativa indipendenza dalle reazioni dell'organismo *in toto* o da quelle di altri tessuti pur recettivi a quel determinato virus, e dall'altro che la dinamica del processo infettivo – dalla fase di infezione latente d'incubazione a quella di infezione latente terminale – è in gran parte dominata dall'azione dell'anticorpo antiviral, che regola e definisce il rapporto tra virus e protoplasma cellulare. Naturalmente le diverse fasi, che sono state qui schematicamente l'una dall'altra distinte, rappresentano nella realtà un tutto continuo e progressivo nell'evoluzione del processo infettivo: esse definiscono soltanto dei momenti successivi, in cui le diverse caratteristiche del rapporto tra i tre elementi della reazione – virus, anticorpo e protoplasma cellulare – possono essere precisate e rese quindi distinguibili l'una dall'altra. La velocità con

cui le diverse fasi si succedono, e quindi la durata di ciascuna, possono essere le più diverse: è qui da ricordare la grandissima importanza che ha nel condizionarle la natura del tessuto (ad esempio, la recettività elettiva per il virus degli elementi cellulari che compongono quel tessuto e in contrapposizione a questa, per gli effetti opposti che ne derivano, la ricchezza in elementi del S. R. I. che il tessuto stesso presenta).

b) *L'immunità verso la superinfezione precoce e l'immunità verso la reinfezione tardiva.*

La definizione di queste diverse fasi che caratterizzano l'evoluzione del processo infettivo ha un'importanza fondamentale per la comprensione del meccanismo con cui lo stato immunitario si stabilisce. Infatti ho potuto dimostrare per il virus erpetico e per il virus vaccinico (Magrassi [24], [26]; Magrassi e De Gregori [27]), che l'immunità verso la superinfezione, altrettanto solida e completa dell'immunità che segue alla malattia, si instaura fin dai primissimi momenti in cui « l'infezione latente d'incubazione » ha inizio in un determinato tessuto: la sua caratteristica essenziale è perciò sostenuta da ciò, che essa è già completamente sviluppata quando ancora la prima infezione sta svolgendosi nell'organismo, in un periodo così precoce da precedere la stessa dimostrabilità del virus dell'infezione primitiva nei tessuti recettivi. In questo periodo, all'infuori della resistenza alla superinfezione, nessun altro segno si nota nel tessuto, che attesti che il virus della prima infezione sia quivi già presente: da ciò si arriva alla deduzione, che il mezzo più squisito per rivelare il virus al suo primo giungere in un tessuto non ci è dato dalla capacità infettante del tessuto, ch'è funzione della recettività dell'animale nel quale il passaggio si pratica, ma dall'insorgenza nel tessuto dell'immunità verso la superinfezione.

Tale immunità, del tutto indipendente dal comportamento degli anticorpi umorali, è perciò strettamente legata nel suo inizio e nella sua diffusione collo stabilirsi e coll'evolversi del processo infettivo. Si può affermare che l'immunità segue in questo caso come un'ombra il processo infettivo, o meglio che l'immunità si sovrappone all'infezione come una positiva alla propria negativa fotografica:

perciò l'estendersi dell'immunità segue con assoluta esattezza la diffusione del virus nel tessuto. A questo proposito è particolarmente significativa l'esperienza di Doerr e Hallauer [31], che a completamento di miei precedenti risultati riuscirono a dimostrare, valendosi di ceppi determinati di virus erpetico e di particolari vie d'iniezione, che quando la diffusione del virus neurotropo è limitata ad una determinata parte del sistema nervoso centrale, unicamente in quella parte si stabilisce lo stato immunitario, mentre il resto del tessuto nervoso presenta verso il virus della superinfezione una normale recettività.

Doerr [32], particolarmente partendo dalle osservazioni raccolte nel campo dei virus neurotropi, ha dato risalto alla modalità di diffusione parallela dell'infezione e dell'immunità introducendo una denominazione molto descrittiva, anche se difficilmente traducibile in un'espressione italiana altrettanto elegante: egli infatti parla di « Schieneninfektion » e di « Schienenimmunisierung » a significare appunto la diffusione dell'una e dell'altra su preordinate « rotaie » che sono quelle stesse che consentono la diffusione del virus. Man mano che il virus scorre, per così dire, su tali rotaie, dalla porta d'entrata periferica fino ai più diversi tessuti, esso può perdere in capacità infettante e patogena, così che talora può accadere che l'infezione si esaurisca per via, in modo che il virus finisce col l'invadere una parte soltanto del tessuto recettivo. Questa possibilità è stata, ad esempio, dimostrata per i virus neurotropi (virus erpetico) da Doerr e Kon [33]. Questa perdita di capacità infettante e patogena da parte del virus è facilmente comprensibile, se si pensa come evolve la dinamica del processo infettivo in un tessuto: si tratta di un progressivo continuo modificarsi del rapporto quantitativo tra virus ed anticorpi nel protoplasma cellulare che della reazione è sede, man mano che il virus spontaneamente migra e si diffonde; quanto più lentamente tale migrazione si avvera, tanto più chiaramente interviene la progressiva modificazione di questo rapporto, che ha come condizionanti fondamentali la recettività e la possibilità reattiva immunitaria del tessuto verso il virus, e che praticamente si esprime attraverso le successive fasi del processo infettivo, che abbiamo già definite. In conclusione si può ritenere dimostrato che mentre un'infe-

zione da virus sta evolvendo in un tessuto, in esso la superinfezione con virus omologo o strettamente affine è incapace di determinare lesioni, e che questo stato di resistenza si instaura con straordinaria rapidità.

Il meccanismo di questa immunità verso la superinfezione è precisato dal fatto dimostrato *in vivo* (Magrassi e De Gregori [27]) e *in vitro* (Galli [28]), che il tessuto, il quale, in seguito all'infezione latente che in esso si svolge, presenta un'immunità solidissima verso la superinfezione, è capace di fissare il virus aggiunto con la superinfezione come un tessuto normale: non esiste cioè nessuna incompatibilità nella cellula tra il virus presente in essa per l'infezione latente primitiva e quello che viene aggiunto con la superinfezione. Questa constatazione esclude senz'altro l'ipotesi di un'« immunità da occupazione », che potrebbe essere prospettata per spiegare l'immunità verso la superinfezione.

Eccoci ora al secondo punto del problema: se il virus reinoculato in un tessuto già infetto viene su di questo fissato come su un tessuto normale, per quale ragione è incapace di determinarvi quelle lesioni che, nelle stesse condizioni di esperienza, si osservano costantemente in quest'ultimo? La risposta ci vien data da esperienze mie e dei miei collaboratori (Magrassi e De Gregori [27], Galli [28]) nelle quali fu constatato che un'identica sorte spetta nel tessuto al virus dell'infezione primitiva, decorrente allo stato di latenza, e al virus reinoculato con la superinfezione: lo stesso fattore immunitario, che abbiamo identificato nell'anticorpo neutralizzante a sede tissutale, interviene quale elemento determinante essenziale nella latenza infettiva e nell'immunità verso la superinfezione, ed impedisce nell'un caso e nell'altro la moltiplicazione del virus fino alla soglia patogena, pur permettendone la riconoscibilità per un tempo più o meno prolungato.

Attraverso tale meccanismo la superinfezione si innesta su uno stato di equilibrio già in atto tra protoplasma cellulare e virus, e questo equilibrio non statico, ma dinamico, mantenuto dall'anticorpo neutralizzante già presente nel tessuto quale diretta conseguenza dell'infezione latente primitiva, successivamente progredisce fino alle fasi finali, in cui il virus diviene irriconoscibile nella cellula infettata.

Dopo quanto è stato detto, si capisce come l'esito della superinfezione portata in un organismo che abbia subito la prima infezione in una sede determinata, possa essere diverso a seconda dei tessuti nei quali essa si esercita: tale variabilità è legata da un lato alla presenza nel tessuto del virus dell'infezione primitiva, dall'altro alla variabilità che nel tessuto viene a presentare il rapporto infezione primitiva-immunità, a seconda della virulenza e della quantità del virus, della recettività del tessuto al virus e delle sue possibilità reattivo-immunitarie. Tutti questi fattori uniti concorrono a dare ad alcuni tessuti e in particolar modo al sistema nervoso centrale una relativa autonomia nel comportamento immunitario, rispetto ad altri tessuti dell'organismo.

La diversità osservata nel destino del virus a seconda che esso venga reinoculato nelle primissime fasi (qui finora considerate) in cui l'immunità, durante l'evoluzione dell'infezione primitiva, si è istituita, o venga reiniettato nelle fasi più tardive dell'immunità (dopo la malattia o in seguito a un trattamento di iperimmunizzazione), dipendono essenzialmente dal contenuto quantitativo in anticorpi neutralizzanti degli umori o dei tessuti: nel primo caso l'anticorpo neutralizzante a sede esclusivamente o prevalentemente tissutale agisce in quanto permette l'instaurarsi di un rapporto di equilibrio cellula-virus, tale che porti l'infezione e con essa la superinfezione verso la fase latente piuttosto che verso quella manifesta; nel secondo caso l'anticorpo, presente in quantità molto superiore, sia negli umori che nei tessuti agisce *in vivo* in modo analogo a quello che nelle prove *in vitro* si osserva nelle miscele « superneutralizzate », e porta alla rapida e completa neutralizzazione irreversibile del virus come si ha nella fase di « autosterilizzazione ».

Deve perciò ritenersi giustificato l'identificare, nel loro meccanismo, l'immunità precoce verso la superinfezione e l'immunità più tardiva verso la reinfezione, quando questa coincida col periodo della cosiddetta « autosterilizzazione », od anche lo superanzi.

In questa interpretazione del meccanismo immunitario viene escluso un attivo intervento di quelle cellule, che per le loro specifiche funzioni fagocitarie si considerano partecipanti alla normale difesa antiinfettiva dell'organismo, quali le cellule mobili e fisse connettivali di tipo macrofagico (cellule del S. R. I. in senso lato)

ed i leucociti polinucleati (microfagi). Infatti le osservazioni (Levaditi e Nicolau [3], Nicolau e Kopciowska [5], Andrewes [6]), che testimoniano come in determinate condizioni si possa avere nel tessuto rivelatosi immune la mobilitazione di cellule leucocitarie e macrofagiche, perdono di valore di fronte alla dimostrazione della possibile esistenza di una completa e solida immunità verso la superinfezione, in cui tale mobilitazione cellulare è del tutto assente (Magrassi e De Gregori [7]); d'altro lato le ricerche più recenti condotte *in vivo* e *in vitro* sui leucociti e sulle cellule del S. R. I. hanno escluso che la fagocitosi intervenga in modo sensibile nel determinare l'inattivazione del virus introdotto nell'organismo immune (Sabin [37], Hallauer [38], Smorodintseff e Shishkina [39]). Per quanto riguarda le cellule del S. R. I., le considerazioni negativiste qui riferite si rivolgono solo alla loro funzione fagocitaria come diretto meccanismo difensivo, ferma naturalmente restando tutta la loro importanza, già precedentemente precisata, in rapporto colla produzione dell'anticorpo neutralizzante e colla funzione difensiva che l'anticorpo si trova a svolgere verso il virus nella stessa sede tissutale d'origine.

c) *Rapporto tra durata dell'immunità e persistenza del virus nell'organismo infettato.*

Ho sopra affermato che si debbono ritenere identificabili nel loro meccanismo l'immunità precoce verso la superinfezione e l'immunità più tardiva verso la reinfezione: implica ciò una presa di posizione nel tanto discusso problema del rapporto tra la durata dell'immunità e la persistenza del virus in seno ai tessuti infettati? Purtroppo il problema della persistenza del virus nell'organismo infettato è inficiato in partenza dalla relatività dei nostri mezzi di riconoscimento del virus, che si possono ritenere fondamentalmente basati solo sulla dimostrazione dell'attività patogena o infettante del virus stesso. A questo proposito una netta distinzione si deve porre tra le infezioni da virus che presentano un decorso ciclico, in quanto terminano con un'apparente autosterilizzazione dei tessuti dell'ospite (e sono queste la maggior parte) e le infezioni da virus, che sono caratterizzate da un decorso aciclico, cronico, in

quanto per mesi o per anni gli organismi infetti e divenuti immuni si rivelano portatori di virus facilmente riconoscibile. Già ho discusso il significato che si deve attribuire al fenomeno della cosiddetta autosterilizzazione, nel quale si devono distinguere almeno due fasi: una prima fase in cui il virus è ancora dimostrabile con opportuni artifici di tecnica, che corrispondono essenzialmente a quei mezzi capaci di dissociare il legame virus-anticorpo; ed una seconda fase in cui il virus non è più direttamente riconoscibile, se non in casi eccezionali (Olitsky e Long [40]; Dresel [41]). È appunto per l'interpretazione di quest'ultima fase, che la discussione non può dirsi risolta.

Per il virus vaccinico il problema fu direttamente affrontato di recente da Galli e Scalfi [42]: essi poterono dimostrare che il parallelismo tra immunità e persistenza del virus nei tessuti che subirono l'infezione può essere documentato per un lungo periodo di tempo (137 giorni), corrispondente a circa $\frac{3}{4}$ della durata totale dell'immunità (185 giorni); in una prima breve fase (31 giorni), il virus è ancora dimostrabile facilmente col passaggio, in cui si rivela la sua attività patogena; in una seconda fase assai più prolungata (dal 31° al 137° giorno) la presenza del virus è rivelata soltanto dalla capacità immunizzante, talora trasmissibile in serie (e quindi forzatamente attiva), che conserva la sospensione del tessuto che aveva subito l'infezione. Già in precedenti ricerche di Scalfi [43] era stato messo in luce che la capacità immunizzante dei tessuti, in queste condizioni, è in rapporto con la persistenza in essi di virus modificato dall'azione dell'anticorpo, così che, pur avendo il virus perduto l'attività patogena, conserva tuttavia la capacità di provocare un'infezione latente, da cui dipende la comparsa dell'immunità descritta. Solo in una fase terminale, relativamente breve di fronte alla durata totale dell'immunità (48 giorni su 185), il virus non si riesce più a riconoscere nel tessuto né attraverso la capacità patogena, né attraverso l'attività immunizzante, né sottoponendo il tessuto a trattamenti particolari, come la digestione tripsica e la dialisi, dimostratisi in altre condizioni sperimentali adatte a rivelare un virus inattivato. Si deve perciò concludere, che in quest'ultimo periodo il virus è veramente scomparso dai tessuti, e che l'immunità è capace di sopravvivere per un tempo deter-

minato alla sua scomparsa? Io non credo che a questa conclusione si possa per ora addivenire: la mia personale impressione, basata anche sulla convinzione che uguale sia il meccanismo dell'immunità verso la reinfezione in quest'ultima fase e dell'immunità verso la superinfezione nelle fasi più precoci, è che il radicale virus rimanga presente nel protoplasma cellulare, sia pure durevolmente e irreversibilmente mascherato dall'anticorpo neutralizzante ad esso unito, fino a che duri la solida immunità attiva; ciò servirebbe pure a chiarire la causa della lunga permanenza di anticorpi negli umori, dopo la fine della malattia, quale, ad esempio, fu constatata (talora anche dopo decenni) nella febbre gialla.

Seguendo questa interpretazione, ci si può rendere ragione anche del perchè in alcuni tipi di infezione da ultravirus (ad esempio nell'influenza) l'immunità verso la reinfezione sia di così breve durata: in tali casi, che corrispondono in genere alle infezioni delle mucose dell'albero respiratorio, il rapporto tra virus e tessuto sarebbe tale, da portare ad una rapida eliminazione dell'agente d'infezione.

Questa particolare posizione che verrebbe assegnata, di fronte all'infezione da virus e all'immunità che ne consegue, ai tessuti dell'apparato respiratorio, trova una molto convincente conferma nelle recentissime ricerche di Grabar e Schoen [44] condotte col virus linfogranulomatoso nel topo. In esse fu infatti dimostrato che all'infezione primitiva per via intracerebrale, traducentesi con tipiche alterazioni istologiche, segue un'immunità duratura verso una reinfezione eseguita per la stessa via, immunità che si accompagna ad una prolungata persistenza degli anticorpi virus-neutralizzanti in tale tessuto (in assenza di anticorpi umorali nel sangue circolante); invece, se l'infezione primitiva ha luogo nel polmone, ove, in seguito a inoculazione intranasale, provoca delle pneumopatie linfogranulomatose specifiche ma transitorie, si osserva che parallelamente a una rapida progressiva diminuzione di virulenza del tessuto polmonare accompagnantesi con un abbassamento altrettanto rapido degli anticorpi virus-neutralizzanti in esso contenuti, si ha anche la scomparsa di quello stato immunitario verso una reinoculazione di virus attraverso la stessa via nasale, che è invece presente solo durante il periodo acuto dell'infezione. L'individualità e l'indipendenza dei diversi tessuti di fronte alla moda-

lità di evoluzione e alla durata dell'infezione e dell'immunità, che a questa è legata, trovano perciò anche in queste ricerche una nuova evidente riprova.

Una posizione a sè assumono invece quelle infezioni, che decorrendo col tipo di un'infezione latente cronica aciclica, permettono per lungo tempo (per mesi o per anni) un facile isolamento del virus dagli umori e dai singoli tessuti dell'organismo infettato (quale si può avere, ad esempio, nell'anemia infettiva dei cavalli, nell'encefalomielite murina, nella coriomeningite linfocitaria del topo bianco, nella psittocosi di diversi uccelli e del topo bianco, ecc.).

Si può affermare che in questi casi il processo immunitario che s'accompagna all'infezione si arresta nei tessuti alle prime fasi, corrispondenti a quelle ch'io ho denominato « infezione latente d'incubazione » e « infezione latente di stabilizzazione », in cui la moltiplicazione del virus viene contenuta al di sotto della soglia patogena, in funzione di una reazione endocellulare virus-anticorpo che si mantiene reversibile e labile. L'incapacità di tale reazione a passare nella fase di irreversibilità che caratterizza il processo di cosiddetta autosterilizzazione, è molto probabilmente legata ad un debole risultato immunitario derivante dal rapporto tra virus ed organismo ospite: ne sono causa da un lato la scarsa capacità antigenica di questi tipi di virus, di cui è espressione la difficoltà di dimostrare anticorpi neutralizzanti verso di essi, e dall'altro lato la scarsa sensibilità dell'ospite verso l'azione lesiva di questi agenti infettanti, della quale è conseguenza la facilità con cui questi organismi sfuggono alla malattia manifesta. Con questa ammissione sta in perfetto accordo l'osservazione che tutti questi tipi di virus persistono in genere più a lungo in quelle specie animali, che meno reagiscono all'infezione, sia clinicamente, sia soprattutto immunologicamente. (Un tipico esempio è fornito dai risultati ottenuti da Traub [45], [46], [47] per il virus della coriomeningite linfocitaria, nel topo scarsamente sensibile e cronico portatore, e nella cavia che reagisce con più gravi segni di malattia e con più abbondante formazione di anticorpi). Naturalmente in questi casi si può parlare soltanto di un'immunità verso la superinfezione (secondo un'altra dizione «immunità legata all'infezione»): il meccanismo di essa si identifica con quello già esposto a proposito del-

l'immunità verso la superinfezione nelle fasi precoci (corrispondenti alla « infezione latente d'incubazione » e alla « infezione latente di stabilizzazione ») del processo infettivo ad evoluzione ciclica.

III.

*L'IMMUNITÀ SENZA INFEZIONE; RELATIVITÀ DEL CONCETTO
DI « INATTIVAZIONE » E DI « UCCISIONE » DEL VIRUS.*

Esaurito così, sia pure succintamente, il problema della natura e del meccanismo dell'immunità da infezione, rimane ora da discutere una questione, che assume anche da un punto di vista pratico la massima importanza: se cioè l'immunità nelle malattie da virus si possa ottenere anche al di fuori dell'infezione. Ci si trova così dinanzi ad uno dei punti più controversi, e perciò più battuti, degli studi immunologici sui virus.

Per lungo tempo ha prevalso l'opinione che fosse impossibile una immunità verso i virus a mezzo di una vaccinazione condotta con virus « ucciso ». Questa opinione era in realtà basata sopra una massa imponente di dati, concordemente comprovanti come coll'iniezione di virus « uccisi » nei modi più diversi, chimici (antisettici) o fisici (calore) non si ottenessero che degli insuccessi. Di fronte a questi dati però, sono andate via via moltiplicandosi le osservazioni che testimoniano come sia possibile ottenere in determinate condizioni un'immunità più o meno solida e più o meno durevole anche sottoponendo i virus vaccinatori a trattamenti chimici (tipiche la formolizzazione e la fenicatura) o sierologici (aggiunta di siero immune) capaci di far perdere a questi la loro capacità infettante. Queste osservazioni parvero demolire il dogma classico per le infezioni da virus: nessuna immunità senza infezione. In realtà però le ricerche più recenti hanno dimostrato la necessità di una revisione di tutto il problema, soprattutto per ciò che riguarda i limiti della contrapposizione tra virus « vivente » e virus « ucciso », sia pur prescindendo dalla scarsa opportunità di usare i termini impegnativi di « vivente » e di « ucciso » per elementi che hanno per sé riportato alla ribalta l'agitato problema del concetto stesso di « vita ».

Innanzitutto riassumiamo brevemente quali sono le condizioni essenziali per cui un virus reso in vario modo inattivo sia ancora capace di determinare un'immunità attiva.

Per quanto riguarda il trattamento con miscele apparentemente neutre di virus-siero immune potè essere chiaramente documentato (Magrassi e Muratori [48]), che una solida immunità può essere con esse ottenuta solo ed in quanto si stabilisce in seguito all'inoculazione della miscela un'infezione latente nei tessuti provati.

Rientra perciò questa forma d'immunità entro i limiti dell'immunità verso la « superinfezione »: e di questa essa ha infatti tutti i caratteri fondamentali. Naturalmente non si può qui più parlare di virus inattivo, in quanto il processo di neutralizzazione del virus nella miscela è tale, da consentire l'instaurarsi nei tessuti di un'infezione, sia pure decorrente allo stato di latenza. Con le miscele superneutralizzate invece, in cui la dissociazione del virus dall'anticorpo non è possibile, potè ancora essere ottenuta la produzione di anticorpi neutralizzanti, dimostrabili nel sangue in quantità anche notevole, ma l'immunità da esse provocata si rivelò scarsa o nulla: in queste condizioni il virus, pur conservando evidentemente la attività antigenica, perde colla capacità infettante anche l'attività immunizzante. Risultati del tutto analoghi furono ottenuti da miei collaboratori (Scalfi [43]; Galli e Scalfi [42]) nei trattamenti con sospensioni di tessuti usciti apparentemente autosterilizzati da un'infezione vaccinica. Anche in questo caso i tessuti possiedono un elevato potere immunizzante, solo quando siano ancora capaci di determinare un'infezione latente; in una fase successiva il virus in essi presente dimostra ancora un'attività antigenica, testimoniata dalla capacità alla produzione di anticorpi, ma è divenuto incapace di provocare uno stato immunitario apprezzabile (Scalfi [3]).

Il processo di svirulentazione dei tessuti infettati con virus vaccinico si riassume perciò in 3 fasi successive; 1° in cui i tessuti sede dell'infezione sono virulenti e quindi immunizzanti; 2° in cui i tessuti divenuti avirulenti conservano tuttavia la capacità immunizzante (attraverso la provocazione di un'infezione latente); 3° in cui i tessuti perdono oltre che la virulenza anche la capacità immunizzante pur conservando la capacità di produrre anticorpi antivirulenti (conservazione dell'attività antigenica del virus).

Già da questi risultati si profila nettamente la distinzione tra attività antigenica e attività immunizzante del virus: per quanto essi possono deporre, quest'ultima si rivela legata esclusivamente alla capacità infettante del virus, e può apparire del tutto indipendente dalla presenza di anticorpi neutralizzanti nel sangue.

Questa distinzione appare anche più evidente dalle ricerche condotte con i virus formolizzati.

I processi di formolizzazione tolgono al virus la capacità infettante, e quindi l'attività moltiplicativa e lesiva; il virus viene perciò in queste condizioni in genere definito « inattivato » od « ucciso ». Tuttavia il virus conserva perfettamente l'attività antigenica, così che l'iniezione di esso provoca nel sangue circolante la comparsa di anticorpi in quantità uguale o anche superiore a quella che si può avere in seguito all'infezione manifesta. Nonostante ciò, enormemente inferiore a quello che si potrebbe sospettare attraverso una titolazione degli anticorpi umorali, si rivela l'immunità a livello dei tessuti recettivi: si può affermare che in queste condizioni la capacità protettiva dell'anticorpo presenta le stesse limitazioni che abbiamo elencato per l'immunità passiva generale (Magrassi e Muratori [8]). Tale stato immunitario si dimostra perciò più facilmente nelle infezioni a tipo setticemico, o nella inibizione alla generalizzazione di lesioni quando il virus, partendo da un primitivo focolaio d'infezione, si vale di una diffusione umorale, o nei casi in cui si forzino artificiosamente i processi di permeabilità dal sangue ai tessuti. Da alcune mie ricerche inedite condotte col virus vaccinico ho tratto anzi l'impressione che ancora più labile, in confronto all'immunità passiva generale, sia a livello dei tessuti recettivi l'immunità ottenibile per via generale col virus formolizzato. Si ha perciò qui una prova estremamente chiara di quanto grande possa essere la scissione tra l'attività antigenica e l'attività immunizzante del virus; gli anticorpi neutralizzanti umorali, che si producono a titoli molto elevati col virus formolizzato, vengono ad essere in tutto o in gran parte inutilizzati, di fronte all'infezione portata direttamente nel tessuto recettivo.

Ma anche per il virus formolizzato la distinzione tra attività antigenica e attività immunizzante non può considerarsi assoluta: poté infatti essere dimostrato da Magrassi e Muratori [48] e suc-

cessivamente da Galli e Verrotti [49] e da Galli e Cipollone [50] che il diretto trattamento col virus inattivato di un tessuto altamente recettivo (testicolo) al virus vaccinico, provoca in tale tessuto l'insorgenza di uno stato immunitario altrettanto solido di quello che si può ottenere attraverso l'infezione, senza che di questa si possa riconoscere alcuna traccia. Si tratta di un'immunità strettamente locale, limitata al tessuto che è stato direttamente e ripetutamente pretrattato, per così dire imbibito, colla sospensione di virus formolizzato; tale immunità si rivela del tutto indipendentemente dagli anticorpi neutralizzanti del sangue. La natura di questo tipo di immunità, che sembrava in un primo tempo per alcune sue caratteristiche discostarsi anche dall'immunità da infezione, è oggi suscettibile di una suggestiva interpretazione sulla base di successive ricerche di Galli e Vieuchange [51], [52].

Questi Autori dimostrarono che il virus che attraverso la formolizzazione ha perduto interamente la capacità infettante così da apparire « ucciso », può riacquistare tale capacità infettante in misura quantitativa se non completa rispetto a quella iniziale, sempre però notevole, a mezzo di un trattamento di dialisi o di digestione tripsica del mestruo (sospensione di testicolo o di cervello), in seno al quale la formolizzazione del virus è avvenuta; tale riattivazione del virus si dimostra invece inattuabile quando la formolizzazione abbia avuto luogo invece che sul mestruo tissurale complesso contenente il virus, sulla stessa sospensione tissurale che abbia però precedentemente subito il processo di dialisi (Galli e Vieuchange [52]), o sui corpuscoli elementari purificati dello stesso virus (Levaditi e Reinié [43]), ed anche quando la formolizzazione sul mestruo tissurale abbia agito per un tempo più prolungato (Galli e Vieuchange [52]). In queste condizioni la formolizzazione del virus toglie a questo la capacità di determinare l'immunità locale, a cui ho sopra accennato (Galli [54]): ne consegue che la provocazione di tale particolare stato immunitario è legata ad un virus che sia in tal modo modificato dal formolo, da consentire ancora una sua riattivazione. Si dimostra così di quante delicate fasi intermedie consti il passaggio dal virus vivente ed attivo al virus artificialmente inattivato, o per usare una parola meno propria ma più espressiva « ucciso »: appunto una di queste fasi

intermedia, in cui il virus si trova in uno stato di attività latente, come rivestito o incapsulato nelle proteine formolizzate del mezzo tissurale (secondo l'interpretazione di Galli e Vieuchange [51], [52]), è rappresentato da quella modificazione del virus, per cui questo è ancora capace di provocare, senza dimostrabile infezione, un solido stato immunitario locale. È probabile che in questo stato di modificazione intermedia il virus sia ancora capace di fissarsi al protoplasma della cellula recettiva, mentre è certamente incapace di qualsiasi processo moltiplicativo: di qui la necessità di imbeverare, per così dire, del virus la cellula o il tessuto per ottenere in essi quella reazione immunitaria, ch'è diretta conseguenza del legame cellula-virus; di qui il mantenersi strettamente locale dello stato immunitario per la mancata diffusione del virus; di qui infine la mancata dimostrabilità diretta dell'infezione.

Anche per un altro esempio, tanto spesso usato per sostenere come anche con un virus ucciso sia possibile ottenere un buon effetto immunizzante, si è oggi riaccesa la discussione: si tratta della vaccinazione antirabbica. Si era infatti per essa dimostrato che il virus riscaldato in modo da essere certamente distrutto presenta scarso o nullo valore vaccinante, mentre d'altro lato le emulsioni eterizzate permangono attive fino a che esse conservano ancora del virus vivente: invece per il virus fenicato, secondo Fermi, sembrava ormai pacifico che l'elevata immunità con esso ottenibile fosse dovuta ad un virus assolutamente incapace di provocare infezione, anche se inoculato per via intracerebrale. Ma di recente Lepine e Sautter [55] hanno dimostrato che anche le emulsioni fenicate contengono ancora virus capace di determinare nell'animale sensibile delle lesioni specifiche tipiche nelle cellule recettive del nevrasso (cellule ganglionari del corno d'Ammon). Anche in questo caso perciò non si avrebbe una vera uccisione del virus, ma solo un'attenuazione sufficientemente spinta da renderlo incapace di determinare la malattia, pur lasciandogli quel tanto di vitalità necessaria a determinare le lesioni specifiche cellulari: anche qui perciò lo stato immunitario si può ricondurre a una diretta fissazione del virus sulla cellula recettiva.

Si arriva così ad una conclusione di grande importanza: a mezzo di processi chimici o di artifici sperimentali è possibile conferire ai

virus delle caratteristiche intermedie tra il virus « vivente », cioè capace di moltiplicarsi attivamente nell'organismo e di determinarvi l'infezione ed eventualmente la malattia, e il virus « ucciso », cioè incapace di attivamente fissarsi sull'elemento cellulare, e quindi di determinarvi un processo infettivo. Si può in tal modo costruire tutta una scala di fasi intermedie tra i due estremi soprariferiti: virus infettante e virulento, capace di provocare un'immunità solida attraverso la malattia; virus infettante, ma attenuato nella sua virulenza (o nella sua attività moltiplicativa), capace di provocare un'immunità solida attraverso l'infezione decorrente allo stato di latenza; virus non infettante, ma ancora suscettibile di fissarsi attivamente sulle cellule recettive, senza però possibilità di moltiplicazione sia pur scarsa e quindi di diffusione, capace perciò di provocare un'immunità solida solo nelle cellule con cui viene direttamente a contatto; virus non infettante, ed incapace di un'attiva fissazione sulle cellule recettive, ma ancora dotato di attività antigenica, capace come tale di provocare la formazione di anticorpi neutralizzanti, e un'immunità incompleta e labile, che essendo legata agli anticorpi umorali, possiede anche tutte le limitazioni osservate nella capacità difensiva di questi ultimi.

IV.

DEDUZIONI CONCLUSIVE.

Ciò che siamo andati via via esponendo ci permette ora di arrivare ad una visione comprensiva e riassuntiva del problema immunitario nelle infezioni da ultravirus.

Pur riconoscendo l'impossibilità a raccogliere in un unico tipo il meccanismo dei fenomeni immunitari osservati, si può tuttavia attribuire ad essi un unico denominatore comune, il quale ne costituisce, per così dire, la chiave principale: l'esistenza cioè di un anticorpo, la cui attività protettiva si esplica non attraverso una azione distruttrice sul virus, nè inibendo la fissazione del virus sulla cellula, ma modificando profondamente il rapporto tra il protoplasma dell'organismo ospite e il virus, il quale in sede endo-

cellulare viene ad essere inibito nella sua capacità moltiplicativa, e quindi lesiva. Dal diverso associarsi dei tre fattori: virus, cellula ospitante ed anticorpo neutralizzante nascono le possibili combinazioni immunologiche, nella loro diversa espressione fenomenologica.

La decisiva importanza che assume l'elemento cellulare nel condizionare gli effetti della reazione tra virus ed anticorpo, rende ragione delle discordanze osservate tra il comportamento degli anticorpi umorali, e in particolare di quelli presenti nel sangue circolante, e il comportamento dello stato immunitario vero e proprio: benchè quest'ultimo sia spesso accompagnato, nelle infezioni da ultravirus, dagli anticorpi dimostrabili nel sangue, nè il momento della loro comparsa, nè il tasso a cui essi si rivelano, nè la durata della loro dimostrabilità, possono essere considerati come indici espressivi dello stato di resistenza dell'organismo. Si può affermare invece che la condizione essenziale a che l'anticorpo possa esplicare la sua azione difensiva è che esista un intimo stretto rapporto tra le cellule e l'anticorpo stesso.

Tale rapporto risulta ottimale nei tessuti nei quali il virus sia presente: ne consegue quindi la particolare posizione che assume l'immunità verso la superinfezione di fronte ad altre forme di immunità. Ancora non definitivamente precisabile è la causa che permette all'anticorpo di esercitare una più efficace azione difensiva sulla cellula, quando anche il virus sia in questa presente: l'ipotesi per ora più attendibile è che in tal caso l'anticorpo rappresenti nella cellula recettiva una diretta risposta reattiva alla presenza in essa dell'agente infettante, il quale verrebbe ad assumere così il ruolo di stimolo alla formazione endocellulare dell'anticorpo, e di elemento fissatore nella cellula dell'anticorpo stesso. Resta ad ogni modo dimostrato che l'immunità in questa evenienza si presenta assai solida ed a rapidissima insorgenza.

Da questa constatazione nasce l'opportunità, per ottenere l'*optimum* di immunità, di determinarla attraverso il meccanismo di un'infezione latente: e questa è in realtà la traccia che dovrà essere tentata e seguita per raggiungere migliori successi nel campo tanto importante della prevenzione delle malattie infettive da ultravirus. Tale infezione latente, con la solida immunità che ne conse-

gue, può essere tra l'altro ottenuta a mezzo dell'iniezione di piccole dosi « subcliniche » di virus (come poté dimostrare anche Scalfi [56] per il virus vaccinico); ma i risultati tratti da questo metodo presentano troppe irregolarità, oscillanti tra le due possibilità opposte, dell'affioramento cioè di un'infezione manifesta o della mancanza di attecchimento del virus, per consentire una pratica applicazione di esso a un trattamento vaccinante. Lo scopo ideale dovrebbe essere quello di ottenere una modificazione del virus tale che pur eliminando la capacità patogena e lesiva di esso ne mantenga la capacità infettante, così da riuscire a provocare quell'infezione che pur decorrendo allo stato di latenza e quindi senza nessuna ripercussione morbosa sull'organismo, porti però con sé una solida e duratura immunità, quale solo potrebbe essere raggiunta dopo il superamento della malattia. Tentativi in questo senso già sono stati compiuti di recente, e tuttora si perseguono: basti citare per il virus poliomielitico nell'uomo il tentativo di Kolmer [57] con aggiunta al virus di ricinoleato sodico e quello di Schmidt e collaboratori [58] per l'afte epizootica e per la peste aviaria con gli adsorbati di virus su complessi di idrossido di alluminio.

Bisogna tuttavia riconoscere che siamo ancora ben lontani da una soluzione ideale, che tolga alla vaccinazione preventiva eseguita con questo mezzo ogni pericolo e che nel tempo stesso conferisca in alta percentuale una solida immunità: rimane pur sempre come prototipo dei risultati qui ottenibili il trattamento con virus vaccinico nel campo dell'infezione vaiolosa.

Si spiega così l'insistenza da parte degli studiosi nei numerosi tentativi di immunizzazione con virus inattivato, con virus cioè che ha perduto completamente la sua capacità infettante; tra i mezzi più usati a questo scopo può essere senz'altro considerata la formolizzazione.

Già ho insistito su quelle che sono le limitazioni e la relatività dello stato immunitario ottenibile con questo mezzo: nè credo che questa possa essere la strada da cui si possa molto sperare, se non per le malattie da virus a carattere più squisitamente setticemico. Forse si potranno raggiungere risultati migliori solo prendendo in particolare considerazione quegli stadi intermedi di vita del

virus, che anche nei processi di formolizzazione o di fenicatura caratterizzano il virus prima ch'esso giunga alla completa inattivazione: tali stadi intermedi devono essere contrassegnati da un lato dalla conservazione della capacità infettante del virus, intesa come capacità ad una sua attiva fissazione sull'elemento cellulare, anche se questa viene ad assumere attributi e caratteristiche tutte particolari, dall'altro da una limitazione nell'attività moltiplicativa del virus o da una modificazione nella funzione « denaturante » di questo sul protoplasma cellulare, tali da mantenere costantemente questa moltiplicazione al di sotto della soglia lesiva per l'elemento cellulare che ospita il virus stesso.

Le recenti ricerche ad orientamento chimico-fisico sulla struttura delle virus-proteine potranno probabilmente aiutare a risolvere anche questo aspetto del problema immunitario. Una più precisa conoscenza della struttura chimica e chimico-fisica dei virus aprirà infatti anche la possibilità di agire sul loro complesso molecolare imprimendo ad esso quelle modificazioni che, se pur lievi e magari limitate ad incidere semplicemente sull'orientamento spaziale delle molecole che costituiscono il virus, siano però sufficienti a modificarne in senso inibitorio la funzione a tipo fermentativo di cui è espressione l'attività « denaturante » sul protoplasma cellulare.

Tutte le ricerche intese a chiarire il meccanismo che sta alla base dell'immunità da virus acquistano un'importanza fondamentale nel segnare la strada ai futuri orientamenti sperimentali e alle possibili realizzazioni pratiche nel campo preventivo e terapeutico delle infezioni da ultravirus: è perciò questo il punto centrale ed essenziale intorno a cui deve agitarsi e muoversi il problema dell'immunità nelle infezioni da virus. Dalla rapida sintesi che di tale aspetto del problema immunitario io ho cercato qui di tracciare risulta demolita una contrapposizione divenuta ormai classica negli studi immunitari: quella dell'immunità umorale di fronte all'immunità cellulare e tissutale.

Il valore essenziale che viene ad assumere nel meccanismo immunitario l'anticorpo antiviral, che pur potendo trovarsi negli umori, riesce a svolgere la sua utile funzione difensiva solo a livello del protoplasma cellulare, ove tutto il processo immunitario si svolge

e si risolve, toglie infatti a tale contrapposizione di concetti e di termini il suo significato originario; questa constatazione rappresenta la conquista essenziale risultante da questo insieme di ricerche, capace di costituire un preciso punto di riferimento in mezzo alle molte oscurità che ancora avvolgono il problema immunitario nel campo degli ultravirus.

BIBLIOGRAFIA

- [1] DOERR in DOERR u. HALLAUER, « Handbuch der Virusforschung ». Ed. Springer, I, 86 (1938).
- [2] ANDREWES a. ELFORD, « Brit. J. exper. Path. », 14, 366 (1933).
- [3] MERILL, « J. Immun. », 50, 193 (1936).
- [4] BURNET, « J. exper. Med. », 65, 685 (1936); « Austr. J. exp. Biol. a. med. Sci. », 14, 247 (1936).
- [5] BURNET, KEOGH u. LUSH, « Austr. J. exp. Biol. a. med. Sci. », 15, 233 (1937).
- [6] ROUS, Mc MASTER e HUDACK, « J. exp. Med. », 61, 657 (1935).
- [7] MACILL a. FRANCIS, « J. exper. Med. », 65, 861 (1937).
- [8] MAGRASSI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 16, 345 (1935).
- [9] STANLEY a. LORING, « Atti IV. Cong. intern. Pat. Comp. ». Roma, 1939, vol. I, pagina 45.
- [10] DEGWITZ, « Z. Kinderhk. », 25, 134 (1920); 27, 171 (1920).
- [11] HALLAUER in DOERR u. HALLAUER, « Handbuch der Virusforschung ». Ed. Springer, II, 1182 (1939).
- [12] HALLAUER u. MAGRASSI in (id.), II, 1182 (1939).
- [13] SMORODINTSEFF a. SHISHKINA, « Arch. f. d. ges. Virusforsch », 2, 156 (1941).
- [14] KONRADI, « Zbl. Bakt. I. O. », 52, 497 (1909).
- [15] HOWITT, « J. infect. Dis. », 54, 368 (1934).
- [16] HALLAUER, « Z. Hyg. », 118, 605 (1936).
- [17] SABIN, « Brit. J. exp. Path. », 16, 169 (1935).
- [18] SABIN, « Brit. J. exp. Path. », 16, 84 (1935).
- [19] GOYAL, « J. Immun. », 29, 111 (1935).
- [20] ANDREWES, « J. Path. a. Bact. », 31, 67 (1928).
- [21] MAGRASSI e HALLAUER, « Giorn. di Batt. e Imm. », 17, 757 (1936).
- [22] VIEUCHANGE et GALLI, « C. r. Soc. Biol. », 132, 403 (1939).
- [23] LEVADITI et NICOLAU, « C. r. Acad. Sci. », 176, 1768 (1923).
- [24] MAGRASSI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 14, 773 (1935).
- [25] MAGRASSI, « Z. Hyg. », 117, 501 (1935).
- [26] MAGRASSI, « Z. Hyg. », 117, 573 (1935).
- [27] MAGRASSI e DE GREGORI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 16, 505 (1937).
- [28] GALLI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 16, 482, (1937).
- [29] DOERR u. SEIDENBERG, « Z. Hyg. », 119, 135 (1937).

- [30] CIANCARELLI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 20, 250 (1941).
- [31] DOERR u. HALLAUER, « Z. Hyg. », 118, 474 (1936).
- [32] DOERR, « Klin. Wschr. », Nr. 30, 1062 (1936).
- [33] DOERR u. KON, « Z. Hyg. », 119, 679 (1937).
- [34] LEVADITI et NICOLAU, « C. r. Soc. Biol. », 86, 563 (1922).
- [35] NICOLAU et KOPCIOWSKA, « C. r. Soc. Biol. », 110, 348 (1932).
- [36] ANDREWES, « J. Path. a. Bact. », 31, 461 (1928).
- [37] SABIN, « Brit. J. exper. Path. », 16, 158 (1935).
- [38] HALLAUER, « Z. Hyg. », 117, 451 (1935).
- [39] SMORODINTSEFF a. SHISHKINA, « Arch. f. d. ges. Virusforsch. », 2, 175 (1941).
- [40] OLITSKY a. LONG., « J. exper. Med. », 50, 283 (1929).
- [41] DRESEL, « Z. Imm.forsch. », 75, 337 (1932).
- [42] GALLI e SCALFI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 21, 13 (1942).
- [43] SCALFI, « Ann. Ig. », 48, 137 (1938).
- [44] GRABAR et SCHOEN, « Boll. Soc. Chimie Biol. », 23, 281, 291 (1941).
- [45] TRAUB, « J. exper. Med. », 63, 553, 847 (1936).
- [46] TRAUB, « J. exper. Med. », 66, 317 (1937).
- [47] TRAUB, « J. exper. Med. », 68, 299 (1938).
- [48] MAGRASSI e MURATORI, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 16, 588 (1937).
- [49] GALLI e VERROTTI, « Ann. Ig. », 48, 137 (1938).
- [50] GALLI u. CIPOLLONE, « Arch. f. d. ges. Virusforsch. », 1, 350 (1940).
- [51] GALLI e VIEUCHANCE, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 19, 501 (1940).
- [52] GALLI e VIEUCHANCE, « Boll. Ist. Sier. Mil. », 19, 585, (1940).
- [53] LEVADITI et REINIÉ, « C. r. Soc. Biol. », 131, 1140 (1939).
- [54] GALLI, « Boll. e Att. R. Accad. med. di Roma », 66, 385 (1940).
- [55] LEPINE et SAUTTER, « C. r. Soc. Biol. », 127, 192 (1938).
- [56] SCALFI, « Ann. Ig. », 49, 429 (1939).
- [57] KOLMER, « J. Immun. », 32, 341 (1937).
- [58] SCHMIDT, « Z. Imm. Forsch. », 92, 392 (1938).
- [69] SCHMIDT et OERSKOV, « Acta path. et microbiol. scand. », 12, 262 (1935).

RIASSUNTO

Vengono esposti e discussi alcuni dei problemi di maggiore interesse relativi al meccanismo con cui si determina lo stato immunitario verso le infezioni da ultravirus. Sono prese anzitutto in esame le proprietà degli anticorpi virus-neutralizzanti, sia per ciò che riguarda la reattività *in vitro* tra virus ed anticorpi, sia nell'intento di precisare il meccanismo e i limiti dell'attività protettiva esercitata dagli anticorpi virus-neutralizzanti sui tessuti viventi sottoposti ad un'infezione da virus, sia infine per ciò che riguarda la sede di produzione degli anticorpi stessi.

L'immunità da infezione viene studiata attraverso il destino del virus nell'organismo in via di divenire o divenuto immune, prendendo in esame successivamente la dinamica del processo infettivo nello svolgersi delle sue diverse fasi, l'immunità verso la

superinfezione precoce e l'immunità verso la reinfezione tardiva, il rapporto tra durata dell'immunità e persistenza del virus nell'organismo infettato.

*L'IMMUNITÀ
ACQUISITA ECC.*

Viene poi presa in considerazione l'immunità senza infezione apparente, quale può essere ottenuta coi virus detti inattivati: e viene posta in rilievo la relatività del concetto di « inattivazione » e di « uccisione » del virus, che impone un'ampia revisione di tutto questo problema.

Vengono infine esposte le deduzioni conclusive, da cui risulta il valore essenziale che viene ad assumere nel meccanismo immunitario l'anticorpo antivirale che, pur potendo trovarsi negli umori, riesce a svolgere la sua utile funzione difensiva solo a livello del protoplasma cellulare, ove tutto il processo immunitario si svolge e si risolve.

97978

Esemplare fuori commercio per
la collezione dell'istituto di
legge.

330542









