

DESPRE ETIOLOGIA VIROTICA A REUMATISMULUI ACUT II. CERCETĂRI CU PRIVIRE LA IZOLAREA VIRUSULUI

A. Ábrahám, Z. Papp

Deși concepția virotică despre reumatismul acut este veche, totuși unii autori adoptă și astăzi o atitudine netă în favoarea ei. *Pearce* (1939) a inoculat virusul M III — virus patogen pentru iepuri — pe cale intravenoasă la aceleași animale și a observat apariția unei pericardite. El susține că inflamația collagenului, localizarea specifică și aspectul similar al tabloului histologic ar pleda pentru supoziția că și reumatismul ar fi o boală virotică.

Loewe și *Lenke* (1940) au infectat iepuri pe cale intracerebrală cu lichid cefalo-rahidian (l.c.r.) prelevat de la reumatici fără să obțină rezultate concludente. *Copeman* (1944) a injectat sînge de reumatici pe cale intravenoasă la voluntari și a observat unele simptome reumatismale. Foarte interesante sînt și experiențele lui *Mc.Neal* (1946) care, injectînd sînge provenit de la reumatici pe ou embrionat de găină, a obținut leziuni caracteristice vitozelor. *Schlessinger* și colab. (1933) au găsit corpusculi elementari în lichidul pleural, pericardic și articular al reumaticilor, care aglutinează cu serul bolnavilor de reumatism. Valoarea acestor rezultate a fost mult micșorată de faptul că aglutinarea pozitivă s-a obținut și cu exudatul artritei gonococice. *André* și *Ravena* (1934), efectuînd pe iepuri inoculări repetate pe cale intraperitoneală cu sînge provenit de la reumatici, au provocat tromboendocardită și rareori miocardită în focar, dar nu au obținut niciodată malformațiuni la nivelul articulațiilor. Cu toate că *Aschoff*, *Fahr*, *Schottmüller*, *Skvorcov* și alți autori au susținut ipoteza etiologiei virotice a bolii, totuși numeroși cercetători discută despre originea streptococică a bolii, iar unii presupun o asociație între virus și streptococ. După *Danielopolu*, streptococul nu ar avea un rol determinat în apariția bolii, deoarece reumatismul acut poate să apară și fără un focar de infecție streptococică. *Koldniikaia* (1961) relatează despre pătrunderea streptococilor pe calea rino-faringeană și răspîndirea lor pe cale hematogenă, ajungînd în miocard. Hemocultura în majoritatea cazurilor este negativă, deoarece metodele actuale de investigație nu sînt încă destul de sensibile. *Leampert* (1961), prin reacția de fixare a complementului la rece, a pus în evidență antigenii de streptococi în sîngele și urina bolnavilor reumatici. *Lavroc* (1962) a obținut la iepuri leziuni miocardice destructive, folosind pentru inoculare atît tulpină vie, cît și omorîtă de streptococi hemolitici. *Marcenco* și colab. (1962) au constatat că streptococii și adenovirusurile participă la declanșarea amigdalitelor cronice. Nu s-a putut preciza însă, dacă streptococii deschid poarta de intrare adeno-virusurilor sau invers.

Zallesski și colab. au efectuat inoculări pe ouă embrionate de găină fără să obțină rezultate concludente. Aceste cercetări au început încă în anul 1956, și

au urmărit obiectivul de a confirma etiologia virotică a reumatismului, fără a se exclude însă importanța infecției streptococice. S-ar putea ca unele tipuri de streptococi să fie purtătoare de virus reumatic. Infecția streptococică ar favoriza pătrunderea și multiplicarea virusului în organism.

În cursul cercetărilor lor, acești autori au izolat în culturi de fibroblaști 27 de virusuri citopatogene care, ca structură antigenică pot fi enumerate în aceeași grupă. Aceste virusuri nu au proprietăți hemaglutinante și sînt fără efecte citopatogene asupra celulelor HeLa. În serul bolnavilor au fost puși în evidență anticorpi neutralizanți care la majoritatea bolnavilor reumatici au arătat o creștere lentă în perioada procesului evolutiv al bolii. Aceiași autori au infectat iepuri pe cale paratracheală cu virus izolat și în 30—40% din cazuri au apărut leziuni pe valvulele cordului și în 60% o miocardită interstițială proliferativă. La unele animale în ziua 64 de infecție s-a dezvoltat o stenoză mitrală, fapt care corespunde histologic cu cele observate în cazul carditei reumatice umane. La aceste animale s-a pus în evidență virusul citopatogen.

Surin și colab. au examinat culturi de țesuturi, întrebunțînd ser marcat fluorescent. Ei au observat că virusul atacă mai întîi nucleul celei în care se localizează și numai după multiplicare ajunge în citoplasmă. Este posibil ca degenerarea fibroblaștilor să fie în legătură cu acumularea maximă a virusului în celulă. Acești autori au examinat 3 virusuri izolate și au constatat identitatea lor din punct de vedere antigenic. Pirogova a reizolat virusul din singele, miocardul, ficatul și creierul iepurilor infectați, constatînd, identitatea serologică cu virusul inițial. Rubina a folosit pentru izolarea virusului ser și emulsia de cheag însă fără rezultat. Dreizin și colab. au adus contribuții considerabile în problema etiologiei virotice a reumatismului. Ei au izolat de la bolnavi reumatici 28 de tulpini pe fibroblaști embrionari umani. La microscopul electronic s-a observat că mărimea corpusculilor elementari variază între 150—180 milimicroni. Virusurile reumatice — numite virusuri „R” — se înmulțesc în culturi de celule de maimuță, nu sînt patogene pentru șoareci și șoarecii nou-născuți, cobai și oul embrionar de găină, își mențin activitățile citopatogene timp îndelungat la -20° , se inactivează la 37° și rapid la $57-70^{\circ}$. Nu aglutinează eritrocitele de găină.

Material și metode

Luînd în considerare rezultatele din literatura de specialitate, am început cercetările noastre propunîndu-ne să izolăm agentul patogen al reumatismului acut. Pentru aceasta am folosit lichid c.r. recoltat steril în faza febrilă a bolii și nu singe, cheag sau spălături faringee. Materialului care a provenit de la 17 bolnavi reumatici în vîrsta de 5—15 ani a fost inoculat după cum urmează:

La iepuri maturi în vîrsta de 2—3 ani, avînd o greutate corporală de 2000—3000 g. Mai tîrziu, din cauza rezultatelor negative am abandonat infectarea iepurilor. Am folosit în total 20 de iepuri.

La șoareci cu ascită tumorală Ehrlich pentru evidențierea eventualei acțiuni oncologice. Am inoculat șoareci cu ascită de 10 zile administrînd pe cale intraperitoneală 0,2 ml lichid c.r., tratat anticipat cu antibiotice și din 10 în 10 zile am efectuat pasaje succesive în abdomenul unor șoareci sănătoși maturi. Din 5 în 5 zile am verificat pe friebu caracterele morfologice-tincturale ale celulelor de ascită tumorală Ehrlich. Am folosit pentru cercetările noastre în total 270 de șoareci albi masculi, maturi a căror greutate a variat între 20—25 g.

La șoareci nou-născuți (24—48 de ore) pe cale subcutanată, în total 160.

Pentru punerea în evidență a efectului citopatogen al agentului patogen am folosit culturi de celule tripsinizate, provenite din ficat de făt uman embrionar în vîrstă de 4—6 luni, precum și culturi de celule miocardice de *Cynomolgus* („CM”), puse la dispoziție de Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R. din București.

Lichidul c.r., după o pregătire prealabilă, a fost cercetat la microscopul electronic prin metoda directă (TESLA BS 242 A) cu umbrire cu paladiu. La martori am folosit lichidul c.r. recoltat de la 3 bolnavi suferind de scleroză în plăci, de la 1 bolnav de meningo-encefalită și de la 1 bolnav de polineurită.

Seroneutralizarea agentului izolat am efectuat-o atît cu serul acelorași bolnavi, cît și cu serul anticoxsackie A_{1-19} și B_{1-16} .

Rezultate

Iepurii infectați au stat sub observația noastră între 30 și 60 de zile lură să fi prezentat simptome de boală. La disecție nu s-au găsit leziuni caracteristice virozelor. Șoarecii nou-născuți nu s-au îmbolnăvit în interval de 30 de zile. Celulele tumorale de ascită Ehrlich ale șoarecilor infectați, au fost verificate pe frobu și nu s-au pus în evidență modificări ale caracterelor morfologice-tincoriale. După 10 zile, ele au fost trecute folosind o diluție de 1:4 în abdomenul șoarecilor sănătoși, unde s-a dezvoltat o ascită tumorală, dar fără acțiune oncologică.

În 5 cazuri din 17 studiate la microscopul electronic am găsit elemente poligonale, avînd o mărime între 120—180 milimicroni, asemănătoare corpusculilor elementari descriși de Dreizin și colab. (fig. nr. 1, 2, 3). În lichidul c.r. provenit de la bolnavi suferind de scleroză în plăci, meningo-encefalită și polineurită, nu am putut pune în evidență asemenea elemente.

Celurile de celule „CM” încoulate cu lichid c.r. recoltat de la copii reumatici în faza febrilă a bolii, au prezentat la 24 de ore după infecție, leziuni specifice. Pînă la celulele presupuse normale, au apărut celule mult mărite plurinucleate, celule gigante cu marginea protoplasmei neclară. În celulele colorate după metoda May—Grünwald Giemsa, am observat nucleii cu nucleoli intens colorați; în vecinătatea acestora s-au putut distinge mai multe particule înconjurate de un halou clar (fig. nr. 1). Mai tîrziu membrana nucleară a dispărut iar particulele respective s-au îngrămădit excentric la periferia protoplasmei (fig. nr. I.). Celulele s-au rotunjit, formînd insule mai mari sau mai mici, dar pe alocuri s-au mai observat atît celule gigante cu particule excentrice cît și celule așa-zise „normale”, dar vacuolizate (fig. nr. III.). În sfîrșit, celulele s-au rotunjit, limita dintre nucleu și citoplasmă a dispărut în unele din ele au apărut particule asemănătoare incluziunilor nucleare cu halou clar și au căzut de pe peretele tubului de cultură (fig. nr. IV.).

În cursul pasajelor succesive, pe liniile celulare s-au observat efecte citopatogene asemănătoare. Lichidul c.r. recoltat de la alți bolnavi reumatici au dat efecte citopatogene similare pe culturi de celule „CM” (fig. nr. V, VI, VII). Culturile de celule necolbrate au dat imagini identice (fig. nr. XI, XII).

În unele cazuri efectul citotoxic nu a început o dată cu apariția celulelor gigante „sînțitii”. Celulele aflate la marginea culturii s-au rotunjit, la început s-au mai observat straturi subțiri de protoplasmă care le legau între ele, pe urmă s-au desprins fie în grupuri, fie izolate, de pe peretele tubului (fig. nr. VIII, IX, X). Celulele „CM” neinfectate, sînt reprezentate în figurile nr. A, B și C.

Particulele producătoare de efecte citotoxice, denumite de noi „R₁”, „R₂” și „R₃” se neutralizează cu serul bolnavilor identici, deci efectul citotoxic nu se produce. Serul bolnavilor conține anticorpi neutralizanți crescînd titrul în cursul bolii. Nu am obținut neutralizare încricșată și nici neutralizare cu serurile anticoxsackie A_{1-19} și B_{1-6} .

Discuții

Unii cercetători susțin că streptococii ar fi agenții patogeni ai reumatismului acut, alții însă incriminează virusurile. Zalesski și colab. au izolat în singele bolnavilor reumatici un virus care a fost reizolat după infectarea iepurilor. Dreizin și colab. au descris forma și mărirea virusului la microscopul electronic. Marcenko și colab. incriminează atît adenovirusurile, cît și streptococii pentru declanșarea bolii. În cursul cercetărilor noastre am folosit 17 lichide c.r. recoltate în faza febrilă a bolii de la copii reumatici și în 5 cazuri am pus în evidență prin metode directe la microscopul electronic particule „R”, avînd o mărime între 120—180

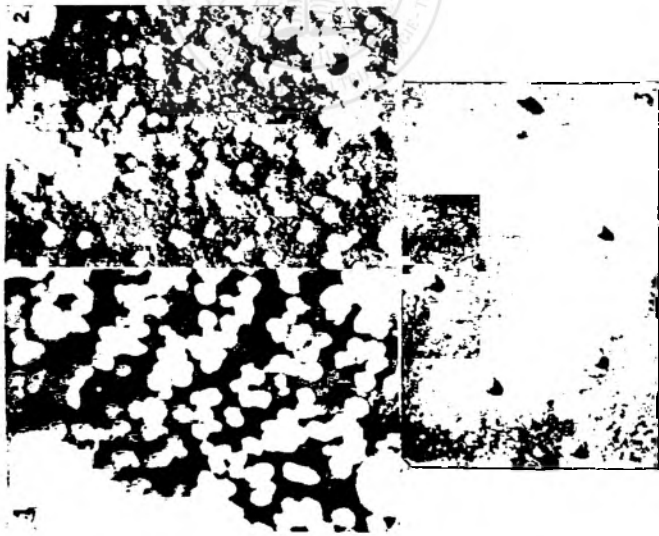


Fig. nr. 1, 2, 3. Corpusculi elementari. Umbrire Pd. Mărire: de 33,000 de ori.

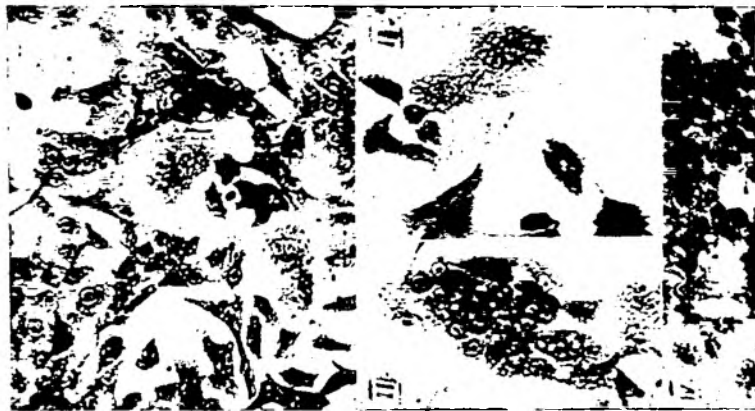


Fig. nr. I, II, III, IV Culturi de celule „CM” infectate cu tulpină „R₃”. Colorație May-Grünwald-Giemsa. Mărire: Ob. zoX; Oc. 7X.

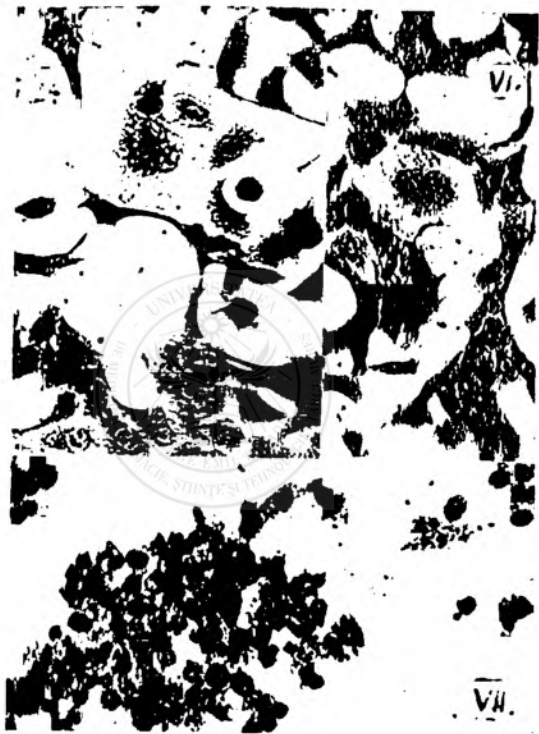


Fig. nr. V, VI, VII Culturi de celule „CM” infectate cu tulpi-
nă „R₂”. Colorație May-Grünwald-Giemsa. Mărire: Ob.
20X; Oc. 7X.



Fig. nr. VIII, IX, X Culturi de celule „CM” infectate cu tulpină „R₂”. Colorație May-Grünwald-Giemsa. Mărire: Ob. 20X; Oc.7X.



Fig. nr. XI, XII. Cultură de fibroblaști embrionari umani. Fără colorație. Mărire: Ob. 20X; Oc. 7X



Fig. nr. A, B, C Culturi de celule „CM” neinfectate. Colorație May-Grünwald-Giemsa. Mărire: Ob. 10-20X;
Oc. 7X

milimicroni. Aceste particule au efect citotoxic asupra culturilor celulare de ficat embrionar uman și asupra celulelor miocardice de *Cynomolgus*. Nu au efect oncolitic asupra celulelor tumorale ascitice Ehrlich, nu îmbolnăvesc șoarecii, nu aglutinează eritrocitele de cobai și găină. După administrarea lor nu am observat leziuni la iepurii maturi. Serurile anticoxsackie nu neutralizează efectul citotoxic, de unde rezultă că nu sînt corpusculi elementari aparținînd grupului de virus Cox-sackie. Cercetări ulterioare vor elucidă problema dacă aparțin grupului de virusuri adeno-, polio- sau altor grupuri de virusuri cunoscute.

Particulele izolate de noi la copii reumatici au caractere antigenice, fapt ce reiese din titrul crescut al anticorpilor serici găsiți la bolnavi. Insuccesul neutralizării încrucișate ridică posibilitatea existenței unui grup și nu a unui singur agent, avînd structuri antigenice diferite. Cercetările noastre viitoare vor studia reacțiile de fixare a complementului, legătura dintre streptococ și grupul „R”, precum și folosirea iepurilor tineri în scop diagnostic.

Sosit la redacție: 18 septembrie 1963.

Bibliografia la autori.