

Disciplina de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: conf. I. László),
Clinică de boli contagioase (cond.: prof. L. Kelemen), Centrul de recoltare
și conservare de sânge (cond.: B. Izsák)

STUDIUL MORFOLOGIC, BIOLOGIC ȘI SEROLOGIC AL TULPINILOR DE VIRUSURI IZOLATE DIN CAZURI DE HEPATITA*

I. László, M. Péter, V. Filep, E. Bálint, A. Ábrahám, A. Izsák, Susana Almási,
Monica Sabău, L. Kasza

Cercetări recente în legătură cu cultivarea unor virusuri izolate din cazuri de hepatite virale au deschis noi perspective în etiologia hepatitelor (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29). Rezultatele sînt însă contradictorii și deci interpretarea lor este foarte dificilă.

În lucrarea de față — bazîndu-ne pe cercetările noastre dintre anii 1957—1964 — încercăm să arătăm unele particularități ale virusurilor izolate din hepatite (18, 19, 20, 21).

Material și metodă

Izolarea virusurilor s-a făcut pe celule embrionare umane (ficat, rinichi), pe linii de celule Detroit-6 și HEP₂. Purificarea și examinarea acestor virusuri, precum și examinarea caracterelor biologice și serologice au fost tratate în lucrările

* Lucrare prezentată la U.S.S.M. Tîliala R.M.A.M. Secția de pat. inf. 26. III. 1964.

noastre anterioare (18, 19, 20). Recent, pentru cultivarea virusurilor și pentru izolarea lor din produse patologice, întrebuintăm o variantă a liniei de celulă Detroit-6, obținută în laboratorul nostru — denumită Detroit-6 (VA). Aceste celule cresc foarte bine într-un amestec de mediu M 199 și Hanks — Earle (M 199 1 parte + Hanks și Earle în părți egale cu un adaos de ser de vițel 10%). Cultivarea virusurilor se face cu ajutorul mediului M 199 1 parte + Earle 2 părți — ser de vițel 10 % și antibiotice PH-ul mediului este ajustat cu NaHCO_3 5%, pină la 7.1—7.6.

Rezultate

1. Studiul morfologic al virusurilor izolate.

În total am studiat 21 de tulpini de virusuri, 11 izolate din sînge și 10 din materii fecale, recoltate de la bolnavi de hepatită.

Încă în 1961 am observat că în unele cazuri de hepatită, pe suprafața hematiilor recoltate se găsesc particule sferice foarte mici, de 10—20 de milimicroni, pe care le-am considerat virusuri. Inocularea serurilor aceluiași bolnavi pe culturi de celule, a provocat alterarea acestora. Fenomenul de adsorbție a virusurilor la hematii, în cazuri de hepatite, descris de noi (18), a fost constatat ulterior și de Ananiev și Subladze (3), de Essen și colab. (11). Totodată am descris prezența unor particule virale în lichidul cefalorahidian al hepatiticilor.

Dintre 21 de tulpini, 18 sînt morfologic similare. Este vorba de corpusculi sferici de 15—70 milimicroni, care au tendința de a forma agregate (20). Majoritatea tulpinilor au fost izolate din hepatite serice, celelalte din cazuri de hepatită epidemică. Virusurile izolate din infecții enterale seamănă cu cele găsite în hepatitele serice. În trei cazuri am izolat particule mai mari cu dimensiuni de 90—180 de milimicroni.

În mod detaliat am studiat patru tulpini: tulpinile RT 110, V/9, R izolate din hepatită serică și tulpina V/6 izolată din hepatită epidemică.

Tulpina RT 110: a fost izolată din serul bolnavei G. E. de 26 ani, cu diagnosticul de hepatită serică, pe celule Detroit-6. Cultivarea am făcut-o în aparat de rotat tuburi. După purificarea supernatantului recoltat din tuburile infectate, prin ultrafiltrare, am examinat materialul la microscopul electronic. Particulele elementare erau de dimensiuni foarte reduse, de 15 milimicroni.

Tulpina R: a fost izolată din serul bolnavei V. E. de 12 ani, cu diagnosticul de hepatită serică, pe celule Detroit-6. Uneori 4—5 corpusculi elementari sferici de 15 milimicroni, se aglomerează, prezentînd particule mai mari asemănătoare cu fructul de mure.

Tulpina V/9: virusul a fost izolat din serul bolnavei F. G. de 30 ani, cu diagnosticul de hepatită serică, pe celule renale umane primare și ulterior adaptat la celule Detroit-6 și HEP₂. Morfologia particulelor elementare, așezarea lor în aglomerate de virusuri este identică cu cea a tulpinii R. Agregarea particulelor elementare este mai pronunțată, dacă ele provin din celule embrionare.

Tulpina V/6: a fost izolată dintr-un caz de hepatită epidemică, în aceleași condiții ca și tulpina V/9. Caracterile morfologice sînt asemănătoare celorlalte 7 tulpini, însă în culturi domină corpusculii elementari mici.

În anul 1964 am recurs la noi izolări cu scopul de a studia susceptibilitatea celulei Detroit-6 (VA). De la trei bolnavi cu diagnostic de hepatită epidemică (cazuri sporadice) am recoltat sînge și materii fecale. Serul diluat la 1:5 și materiile fecale la 1:10 cu mediu M 199, au fost tratate timp de 30 de minute la 60°C, tuburile infectate fiind așezate în aparatul de rotat la 37°C. Serurile bolnavilor chiar după 2—3 zile de la infectarea celulelor, cauzează un efect citopatic transmisibil, care în decurs de 4—6 zile atinge toată populația celulară. După infectarea celulelor cu materii fecale, diluate, efectul citopatic apare numai după 4—6 zile. Dimensiunea particulelor virotice este aceeași ca și a tulpinilor F sau V 9.

Deci din punct de vedere morfologic nu am observat diferențe între tulpinile izolate de noi.

II. Caracterile biologice ale virusurilor izolate

A) Cultivabilitatea

Cultivabilitatea virusurilor și totodată susceptibilitatea celulelor față de virusurile izolate, sînt cuprinse în tabelul următor:

Virus	Celule Detroit-6			Celule HEP ₂			Celule renale umane			Celule de embr. de găină		
	Nr. pas	ECP	Zile	Nr. pas	ECP	Zile	Nr. pas	ECP	Zile	Nr. pas	ECP	Zile
RT-110	I-V	+	6	-	-	-	I-V	+	6	I-V	+	3
R	I-XXV	±	5,5	I-XIV	+	5,8	I	=	4	I	±	5
V/9	I-XI	+	3,3	I-VIII	+	6,5	I-III	++	4	I-II	++	2
V/6	I-XI	±	6,1	I-XIV	±	5,4	I-III	++	5	-	-	-

+ = efect citopatic (ECP) pronunțat, ± ECP parțial

Din tabel reiese, că liniile celulare, precum și celulele embrionare renale umane (primare) pot fi utilizate pentru cultivarea tulpinilor de virusuri hepatice. În cercetările noastre recente varianta tulpinii Detroit-6, Detroit-6 (VA) — obținută de noi — a arătat o sensibilitate mai mare față de virusurile izolate din cazuri de hepatite. Efectul citopatic apare numai atunci, dacă produsul virulent este diluat, iar pH-ul mediului de cultură este 7,4—7,6. Metoda de cultivare a virusurilor în tuburi așezate în aparatul de rotat este mai superioară, decît cultivarea în tuburi staționare. Trebuie să amintim însă faptul, că odată cu adaptarea virusurilor la celulele utilizate, scade treptat și efectul citopatic, fenomen observat la tulpinile R și V/9. Deseori acest fenomen se manifestă prin dispariția efectului citopatic într-o serie de culturi și reapariția lui într-o altă serie. În lichidul culturilor de celule infectate — care nu prezentau alterări — cu ajutorul microscopului electronic am putut pune în evidență particule virotice.

B) Localizarea virusurilor în celulele infectate

Aplicînd colorația acridin-oranj, s-a constatat că virusurile studiate se multiplică în citoplasma celulelor, cauzînd acumularea de ARN în mase compacte.

Secțiunile ultrafine arată modificări importante în reticulul endoplasmatic cu dezintegrarea acestuia, lezarea mitocondriilor și vacuolizarea citoplasmei. În celulele Detroit-6, infectate cu tulpina R, deseori apar formațiuni citoplasmice, înconjurate cu o membrană, asemănătoare cu cele observate la celulele hepatice cu ocazia hepatitei, care poartă denumirea de „citolizomi“. Uneori apar și modificări nucleare, care constau în acumularea unor granule dense în nucleu și pot fi diferențiate de nucleoli. Studiarea acestor modificări nucleare este în curs.

C) Cultivarea virusurilor în embrioni de găină

După inocularea embrionilor de găină pe cale amniotică, pe lângă modificări histopatologice am observat creșterea valorilor aldolazei în lichidul amniotoidian.

La microscopul electronic s-a constatat vacuolizarea nucleilor, umflarea mitocondriilor și dislocarea structurii interne a celulelor hepatice. În citoplasma celulelor infectate apar formațiuni asemănătoare viroplasmiei, atît după infecția cu tulpina R, cît și cu virusul V/9. Patogenitatea tulpinii V/6 pentru embrionii de găină a scăzut în ultimele cercetări. Virusurile R și V/9 se multiplică în celulele membranei corio-alantoidiene a embrionilor de găină, fapt demonstrat cu ajutorul microscopului electronic. Particule virotice similare am observat și în ficatul embrionilor infectați, cu tulpinile amintite.

Virusurile R și V/9 pasate în embrioni de găină își modifică caracterele lor citopatice, deoarece inoculate pe celulele sensibile Detroit-6, dau un efect citopatic foarte redus, care apare după 12—14 zile de la infecție. Deseori însă aceste celule nu sînt lezate.

D) Patogenitatea virusurilor izolate la animalele de experiență

Pentru demonstrarea patogenității virusurilor izolate, la animalele de experiență, au fost inoculați intrahepatic hamsteri și intraperitoneal sau intracerebral șoareci albi.

Virusurile R și V/9 numai la unele cazuri au produs alterarea celulelor hepatice, cu vacuolizarea lor, cu apariția nucleilor monstroși, anisocarie, pinoză și necroză celulară izolată. Adesea se constată infiltrații perivasculare și apariția țesutului conjunctiv.

Virusul V/9 a putut fi adaptat la creier de șoarece, cauzînd paralizia extremităților posterioare în decurs de 7—8 zile. Corpusculii elementari au putut fi reisolați din creierul animalelor sucombate. După al 4-lea pasaj, virusul nu mai provoacă paralizia animalelor. Tulpina R s-a dovedit a fi apatogenă pentru șoareci.

Intr-o serie de cercetări, în legătură cu determinarea susceptibilității șoarecilor, tratați în prealabil cu tulpinile izolate de noi, față de tumoarea Ehrlich, am observat că virusul R și V/6 favorizează creșterea tumorilor în comparație cu alte virusuri (virusul parotitei epidemice, virusul adenotip 3, virusul Cocksackie A₄ etc.).

E) Alte proprietăți ale virusurilor

Virusul R rezistă timp de 15 minute, iar tulpina V/9 10 minute la 60°C. Efectul citopatic — prin tratarea la căldură a virusurilor — scade. Tulpinile R, V/9 și V/6 nu aglutinează hematiile de om tip O, hematiile de găină, cobai și berbec. Sînt rezistente la eter.

Titrul virusurilor după filtrare prin plăcile Columbitt SK, scade foarte mult, probabil prin adsorbția particulelor virotice la filtru.

III. Studii serologice

În scopul cercetării proprietăților imunologice ale tulpinilor de virusuri, au fost efectuate reacții de seroneutralizări și reacții de fixare a complementului.

Neutralizarea virusurilor V/6 și R, arată că aceste tulpini nu au componente antigenice înrudite. Diferența dintre aceste tulpini a fost observată și în reacția de fixare a complementului, efectuată cu aceleași seruri. Într-un caz de infecție accidentală în laborator, reacția de seroneutralizare a confirmat rolul tulpinii R în declanșarea bolii. Deoarece numărul seroneutralizărilor efectuate cu virusurile izolate este mic, în lucrarea de față nu ne ocupăm cu interpretarea detaliată a rezultatelor obținute.

Reacția de fixare a complementului cu antigenele virale R și V/9 la bolnavii de hepatită, a fost pozitivă în 75,8% a cazurilor și negativă în 24,2%. De asemenea s-a constatat că 39% a serurilor provenite de la bolnavii de hepatită, dă reacția de fixare a complementului pozitiv cu ambele virusuri și în 36,8% numai cu un virus.

Titrurile cele mai ridicate le-am observat în infecții parenterale (1:128) pe când la bolnavii cu infecție enterală cel mai ridicat titru a fost 1:8.

Reacția de fixare a complementului la donatorii de sînge a arătat că la 20 de persoane aparent sănătoase RFC-ul a fost pozitiv în 20% și negativ în 80%. La acei donatori de sînge, la care cu ocazia examinărilor medicale s-a constatat o hepatomegalie, sau unele dintre examenele de laborator (determinarea Ubg și bilirubinei în urină, serobilirubinei, reacția Takata, cadmiu, timol etc.) au fost pozitive, RFC-ul a arătat valori pozitive (78,5%).

Discutarea rezultatelor

Cercetările noastre virologice în domeniul hepatitelor urmăresc scopul de a lămuri unele aspecte în această viroză. Astfel, a fost descrisă adsorbția virusurilor hepatitice la suprafața hematiilor provenite de la bolnavi, precum și posibilitatea de cultivare a acestor virusuri pe linii celulare (10, 15, 18, 19, 20, 21, 27).

O observație importantă este că liniile celulare utilizate, precum și embrionul de găină de 4—12 zile cu toate că permite dezvoltarea virusurilor izolate — cu excepția variantei Detroit—6 (VA) — nu sînt optime pentru multiplicarea rapidă a virusurilor. Adaptarea virusurilor la linii celulare și la embrionul de găină, în lipsă de efect citopatic, face greu decelabilă infecția virotică. Virusurile, mai ales tulpina R și V/9 pot imprima o infecție latentă a celulelor. Virusurile izolate de noi se dezvoltă la un pH de 7,4—7,6. Deoarece virusul diluat cauzează o acțiune citopatică mai evidentă, decît cel nediluat, pledează pentru existența fenomenului de autointerferență în înmulțirea virusurilor hepatitelor.

Ratcliffe și colab. (Amer. Journ. Path. Vol. 39, No. 6, 711—718 1961) în cercetările cu privire la transmiterea virusului hepatitei umane la rațe, au constatat că plasma icterogenă a fost mult mai activă în diluții mari, fapt care sugerează prezența fenomenului de interferență în suspensii concentrate. Pornind de la observațiile noastre și de la cele descrise de autorii citați sîntem de părere că pentru izolarea virusurilor din hepatite este necesară diluarea produsului patologic.

În cercetările noastre recente am observat că tratarea serurilor diluate timp de 30 de minute la 60°C prezintă un avantaj în izolarea germeilor, deoarece efectul citopatic apare mai repede, decît în acele cazuri în care s-a folosit ser neinactivat. Nu s-a studiat cauza acestei fenomen, dar foarte probabil că este legată de prezența unor inhibitori nespecifici în serurile native.

Dimensiunile virusurilor izolate de noi sînt mici (15—70 milimicroni). În materialul nostru nu am găsit particule virotice mari — cu cîteva excepții — descrise de *Essen și colab.* (9,10).

Păreră noastră este că dimensiunile particulelor virotice variază cu condițiile de cultivare, dar dimensiunea elementelor virotice de bază este constantă, fiind în jurul a 15 milimicroni.

Transmiterea la hamsteri a virusurilor izolate din hepatite cu toate că dat rezultate interesante, nu este rezolvată. Trebuie să fie extinse cercetările cu privire la modificarea rezistenței acestor animale față de virusurile hepatitei, tocmai pe baza acelor rezultate parțiale, constatate în studiile noastre anterioare.

În cursul experiențelor noastre am observat că virusurile R și V/9 nu-și pierd patogenitatea lor față de om, deoarece în urma unor infecții accidentale de laborator au declanșat într-un caz o hepatită anicterică și într-un alt caz o hepatită cu icter. Perioada de incubație a fost între 4—6 săptămîni.

În experiențele pe soareci am constatat că virusurile R și V/6 modifică receptivitatea organismului șoarecilor față de tumoarea Ehrlich. Acest fenomen se manifestă prin faptul că animalele inoculate în prealabil cu tulpinile amintite, sînt mai sensibile față de tumoarea Ehrlich, decît cele martori (*Biró F., László J., Rácz I., 1962*).

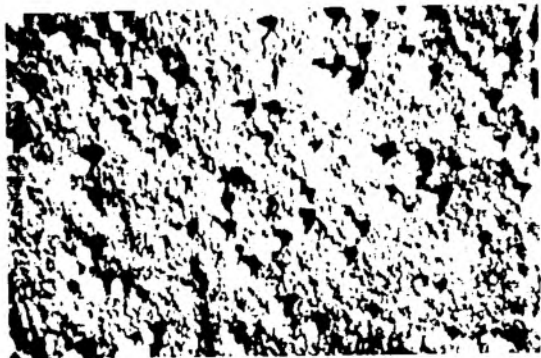


Fig. nr. 1: Corpusculi elementari în l. cr. recoltat de la un bolnav de hepatită. Mărire 36.000X

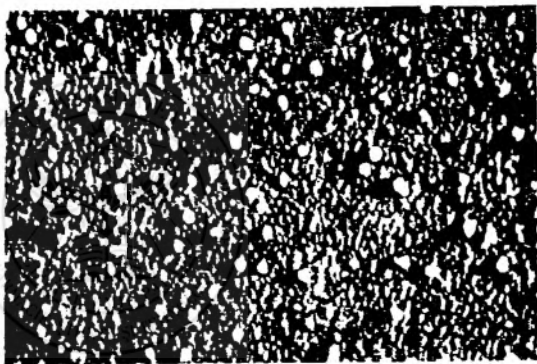


Fig. nr. 2: Tulpina R. Marire 50.000X



Fig. nr. 3: Tulpina II 74, izolată dintr-un caz de hepatită epidemică. Mărire 50.000

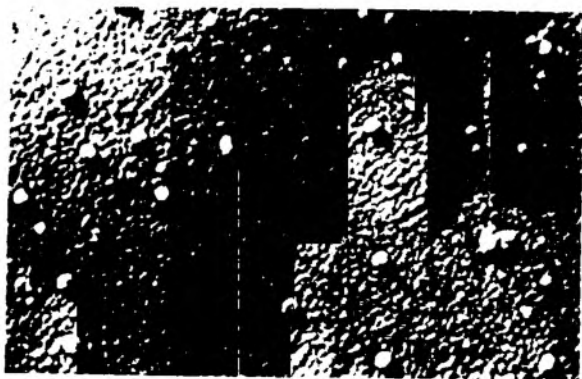


Fig. nr. 4: Tulpina de virus
V 9. Mărire 50.000X.

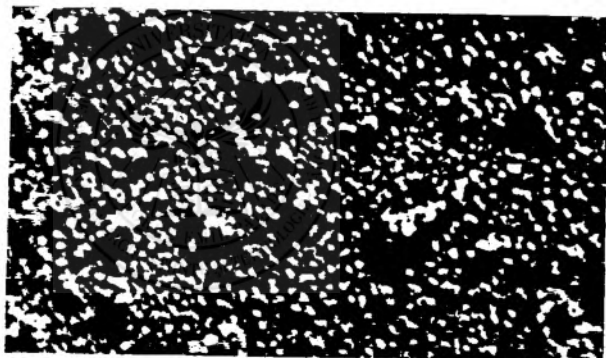


Fig. nr. 5: Tulpina de
virus V 6. Mărire
50.000



Fig. nr. 6: Membrană corio-alantoideană a em-
brionului de găina infectată cu virusul R. Săgea-
ta arată particulele elementare. Mărire 30.000.

I. LASZLO SI COLAB.: STUDIUL MORFOLOGIC, BIOLOGIC SI SEROLOGIC
AL TULPINILOR DE VIRUSURI IZOLATE DIN CAZURI DE HEPATITA

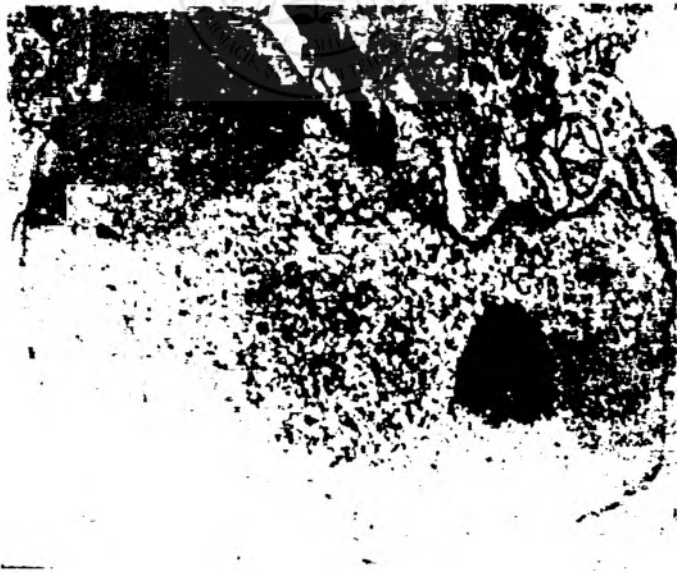


Fig. nr. 7: Celulă Derroit-6, inoculată cu virusul R. Modifi-
cari nucleare. Mărire 27.000

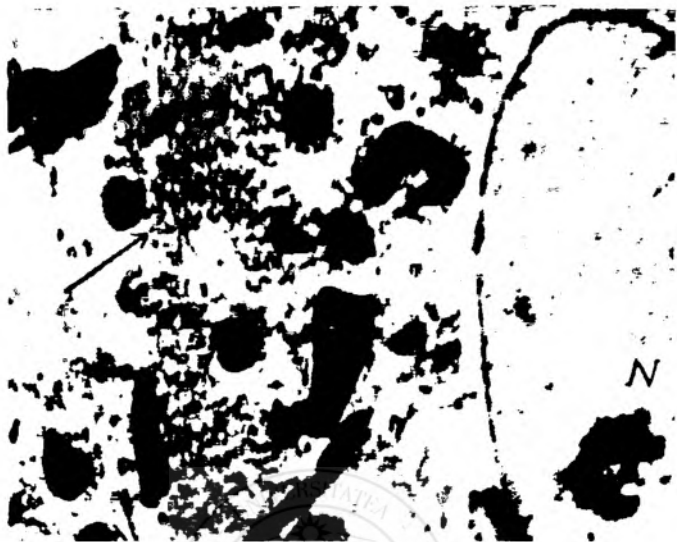


Fig. nr. 8: Ficat de embrion de găină după infectarea embrio-
nului cu virusul R. Formațiuni inclare în citoplasmă. Mărire
27.600

Bibliografie

1. ESKENASY AL. — Probleme de tuberculoză (1961), vol. II. p. 145;
2. ESKENASY AL., DIACONIȚA GH., NICOLESCU P. — Cercetări de fiziologie, (1956), vol. V. p. 403;
3. ESKENASY AL., PAUNESCU EUG. — Arch. roum. Path. exp. (1962), vol. XXI. p. 69;
4. LURIE M. — Ann N. Y. Acad. Sci. (1960), vol. 80, pag. 83;
5. Mirza V. D., REPCIUC E., ESKENASY AL. — Morfol. norm. pat. (1962), vol. VIII. p. 337;
6. NASTA M. — C. R. Soc. Biol., (1928), vol. 99, p. 1089;
7. SABIN F. R. — J. exper. Med. (1938), vol. 68, p. 838;
8. THILANDER H. — Acta Path. Microb. Scand. (1963), vol. 57, p. 57.