

Disciplina de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: conf. I. László),
Disciplina de microbiologie farmaceutică (cond.: I. Steinmetz, șef de lucrări,
candidat în științe medicale) și Disciplina de histologie (cond.: prof. M. Gündisch,
doctor în științe medicale) ale I.M.F. din Tg.-Mureș

IZOLAREA VIRUSULUI HEPATITEI EPIDEMICE DIN APE REZIDUALE SPITALICEȘTI

I. László, I. Steinmetz, V. Filep

În ultimii ani au apărut în literatura de specialitate o serie de lucrări despre izolarea reușită a unor virusuri din cazuri de hepatită epidemică [Rightsel și colab. (12), László și colab. (7, 8), Bolin și colab. (3), Davis (4), Ananiev și Subladze (1), O. Malley, și colab. (10), Arakawa și colab. (2), Kubelka și colab. (6), Kerim-Zade (5), Mitroiu și colab. (11), etc.], majoritatea lor fiind considerate ca tulpini „candidate“ de virusuri hepatitice.

Efectuarea de cercetări ample (morfologice, biologice și serologice), ca cele ale lui Rightsel și colab. (12), László și colab. (7, 8, 9), a demonstrat că unele dintre tulpinile izolate pot fi considerate ca agenți patogeni ai hepatitei epidemice. Virusuri izolate din produsele patologice ale bolnavilor (ser, sînge total, materii fecale, plasmă, etc.) sînt cunoscute. Din ape poluate însă nu au fost semnalate izolări pînă în prezent.

Scopul comunicării noastre este prezentarea încercărilor de izolare a virusului hepatitei epidemice din apa reziduală a secției de hepatită epidemică a Clinicii de boli infecțioase din Tg.-Mureș.

Material și metodă

Recoltarea apei am făcut-o în orele de dimineață (între 8—9), din canalul colector, cîte două probe de apă reziduală în cantitate de 500 ml, determinînd la fața locului temperatura și pH-ul probelor. Probele transportate în laborator au fost păstrate în frigider la -4°C timp de 3—4 zile.

Prelucrarea probelor

După centrifugarea apei, la o turație de 3500 t/min, supernatantul l-am trecut prin filtru G 5 Jena, apoi am încălzit filtratul la 60°C , menținîndu-l timp de 30 minute la această temperatură. Procedeu a dat rezultate bune în izolarea agentului patogen din serul bolnavilor (9). Din fiecare filtrat am inoculat 0,2 ml pe celule Detroit-6 (VA), o variantă a liniei Detroit-6, obținută în laboratorul nostru, mai sensibilă față de virusul hepatitei epidemice, decît celulele originale Detroit-6. Tuburile pentru fixarea virusurilor pe celule au fost menținute timp de 30 de minute la temperatura camerei. După acest timp în fiecare tub am adăugat 1,8 ml mediu de cultură din următoarea compoziție:

mediu Earle 2 părți;

mediu 199 — modificat după Inst. „Dr. I. Cantăcuzino“, 1 parte;

ser de vițel 10%;

vitamine Eagle 1 ml/1000 ml mediu;

penicilină 100 U/ml, streptomycină 50 gamma/ml;

pH-ul mediului a fost ajustat la 7,6 cu ajutorul unei soluții de bicarbonat de sodiu 5%.

Atît tuburile inoculate cu produsele de examinat, cit și cele martore le-am ținut timp de 12 ore în poziție staționară, iar apoi timp de 6—14 zile în aparatul

de rotat. Le-am controlat din 4 în 4 zile, iar pH-ul l-am corectat, adăugând 0,1 ml sol. de bicarbonat 5% (dintr-un amestec de sol. de bicarbonat de sodiu 5% — 1 parte, mediu M 199 — 2 părți).

Pentru a studia multiplicarea virusurilor, celulele Detroit-6 (VA) în cazurile cu modificări caracteristice, le-am fixat după metoda Palade și le-am inclus în Vestopal W. Piesele polimerizate le-am secționat cu ultramicrotomul Reichert și le-am examinat cu microscop electronic tip Tesla BS 242 A.

Cînd efectul citopatic era evident, am recurs la efectuarea reacției de seroneutralizare cu ser al bolnavilor de hepatită, recoltat în convalescență. Seroneutralizarea am făcut-o după metoda uzuală (N. Cajal: Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane. ES București, 1958).

Rezultate

A) *Rezultatele izolării virusurilor din apa reziduală a Clinicii de boli infecțioase, secția de hepatită, sint cuprinse în tabelul nr. 1.*

Tabelul nr. 1.

Nr. crt.	Denumirea tulpinii virusului izolat	Data izolării	Numărul pasajelor efectuate pe celulele Detroit-6 (VA)						
			I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.
1.	HO/1	11.X.964	o	+++	+++	++	+	+	++
2.	HO/2	27.X.964	+	++	+++	+++	--	--	--
3.	HO/3	13.II.965	+++	+	+	+++	--	--	--
4.	HO/4	13.II.965	+++	+	+	+	--	--	--
5.	F 1	11.III.965	+	+	+	+	+	--	--
6.	F 2	11.III.965	+	++	?	?	?	--	--
7.	F I. autoclav.	19.III.965	+	?	o	o	o	--	--
8.	F II. autoclav.	19.III.965	o	o	o	o	--	--	--

Observații: o = fără efect citopatic;
 + = efect citopatic foarte slab;
 ++ și +++ = efect citopatic evident;
 ? = dubios.

Din 6 probe în 4 cazuri ne-a reușit izolarea unor agenți transmisibili. Virusurile izolate după 4 zile de la inocularea probelor pe celule Detroit-6 (VA) cauzează un efect citopatic moderat în focare, cu rotunjirea celulelor și retractarea lor în placarde. În decurs de 14 zile toată masa celulară este atinsă, desprinzîndu-se de pe pereții tuburilor. (Tulpinile HO/1, HO/2, HO/3, HO/4.) În 2 cazuri nu ne-a reușit izolarea, efectul citopatic a fost inconstant și în pasajul nr. V a dispărut sau a fost dubios.

Ca martori am prelucrat 2 probe autoclavate timp de 30 de minute la 1 atm. ele n-au produs efect citopatic pe celulele Detroit-6 (VA). Faptul probează distrugerea agentului patogen prin autoclavare.

Efectul citopatic al virusurilor HO/1—HO/4 este identic cu cel observat la inocularea virusurilor R, V/9, V/6 și 163 S, izolate din sîngele bolnavilor de hepatită epidemică în laboratorul nostru.

B) *Rezultatele reacției de seroneutralizare sint cuprinse în tabelul nr. 2.*

Tabelul nr. 2.

Nr. crt.	Tulpini de virus	Denumirea serurilor și titrul lor utilizat în reacție															
		12. M. A.				13. T. I.				17. B. I.				5. K. I.			
		1/10	1/20	1/40	1/80	1/10	1/20	1/40	1/80	1/10	1/20	1/40	1/80	1/10	1/20	1/40	1/80
1.	HO/1	+	+	+	+	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	+
2.	R ^x	+	+	+	+	o	o	o	o	—	—	—	—	+	+	+	+
3.	V/9 ^x	o	o	o	o	o	o	o	o	—	—	—	—	o	o	o	o
4.	V/6 ^x	o	o	o	o	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+
5.	163 S ^x	o	o	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	o	o	o	±

Observații: + = efect citopatic;

o = lipsă de efect citopatic;

x = virusurile izolate din serul bolnavilor de hepatită;

— = reacția nu a fost efectuată cu acest ser.

Deși numai tulpina HO/1 a fost supusă seroneutralizării cu serul bolnavilor de hepatită, rezultatele sînt interesante. Virusul HO/1, izolat din apa de canal a Clinicii de boli infecțioase, secția de hepatită, este neutralizat de trei seruri din patru. În comparație cu virusurile noastre standarde, tulpina studiată seamănă din punct de vedere antigenic cu virusul R, izolat de noi în anul 1962 — într-o epidemie de hepatită din comuna Rigmány (Regiunea Mureș-Autonomă Maghiară). Virusul HO/1 prezintă înrudiri serologice și cu tulpina V/9 și 163 S.

C) Studiul modificărilor electronmicroscopice ale celulelor infectate cu tulpina de virus HO/1.

Virusul HO/1 provoacă modificări similare celor obținute de tulpinile noastre 163 S și R. După 4—14 zile de la infectare, citoplasma celulelor devine intens vacuolizată și structura normală a reticulului endoplasmatic dispăre. Pe alocuri apar particule în formă de rozetă goală la mijloc, compuse din 4—6 granule mici de cca. 15 milimicroni. Uneori ele se așează în șiruri simetrice. Asemenea formațiuni sînt caracteristice pentru infecția cu virusul hepatitei epidemice.

Interpretarea rezultatelor

În literatura studiată nu am găsit date despre izolarea virusurilor hepatitei epidemice din ape reziduale. Utilizînd mediul de cultură complexă cu un supraadaos de vitamine și folosind linia de celule Detroit-6 (VA), izolarea virusului hepatitei epidemice din apele contaminate devine posibilă.

Tulpina HO/1 a fost neutralizată de serurile convalescentilor de hepatită la un titru de 1/40—1.80, și din punct de vedere antigenic este similară cu tulpinile noastre de virusuri hepatitei R și 163 S. Virusul HO/1 nu a fost neutralizat de serurile antipolio, anti-Coxsackie sau anti-ECHO. Multiplicarea și morfologia virusului HO/1 este identică cu cea a tulpinii R și 163 S: prezintă o termorezistență relativă: timp de 30 de minute nu este distrus la 60° C.

Deoarece reacția de fixare a complementului, efectuată cu serul bolnavilor de hepatită prin folosirea virusurilor R, V/9, V/6 și 163 S, a dat valori pozitive în peste 91% a cazurilor, iar tulpina HO/1 prezintă înrudiri antigenice cu tulpinile noastre, presupunem că virusul izolat din apa poluată este unul din tipurile antigenice ale virusurilor hepatitei epidemice.

Bibliografie

1. ANANIEV V. A., SUBLADZE A. K.: *Vopr. virusol.* (1962), 3, 342;
2. ARAKAWA S., MURAOKA T., KANEKO T., SEKI T., GOTO N.: *Jap. J. Microb.* (1960), 4/4, 371;
3. BOLIN V. S., BRAUNINGER G. E., JUDITH PARDEE, ALSEWER, J. B.: *Transfusion* (1963), V, 3, 6, 455;
4. DAVIS E. V.: *Science* (1961), V, 133, 3470, 2059;
5. KERIM-ZADE K.: *Vopr. Virusol.* (1962), 5, 582;
6. KUBELKA V., SLAVIK K., SOUSEK O., BARTH P.: *Acta Univ. Carolinae Ser. Med.* (1959), Supl 7, 460.
7. LÁSZLÓ I., ÁBRAHÁM S., PÉTER M., KISS E., DOMOKOS L., MAKKAI MARGIT, SZENTKIRÁLYI ÉVA, KOVÁCS F., BÁLINT E.: *Orv. Szemle* (1961), 2, 164,
8. LÁSZLÓ I., PÉTER M., FILEP V., ÁBRAHÁM A., BÁLINT E., PAÁL GYÖRGYI, DOMOKOS L., KASZA L., BEDŐ S.: *Rev. Med.* (1962), VIII, 47.
9. LÁSZLÓ I., PÉTER M., FILEP V., BÁLINT E., ÁBRAHÁM A., IZSÁK A., ALMASI SUSANA, SABÁU MONICA, KASZA I.: *Rev. Med.* (1964), X, 3, 280;
10. O. MALLEY J. P., MAYER H. M., SMADEL J. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1961), 108: 200;
11. MITROIU OTILIA, BARBU C., CAJAL N., DEMETRESCU R., IONESCU T.: *Studii și cerc. inframicrobiol.* (1962), 13, 319;
12. RIGHTSEL W. A., KELTSH, RUTH A., TAYLOR A. R., ROGGS Mc. LEAN I. W. *J.A.M.A.* (1961), 177, 671.