

Disciplina de microbiologie a I.M.F. (cond.: prof. dr. I. László, doctor în medicină)
și Clinica de boli infecțioase (cond.: prof. dr. L. Kelemen, doctor-docent)
din Tirgu-Mureș

STUDII COMPARATIVE ÎNTRE ANTIGENUL AUSTRALIA ȘI VIRUSURILE IZOLATE DE NOI DIN HEPATITE

Dr. I. László, dr. Sanda Munteanu, V. Filep, dr. L. Kasza

Reușita izolării virusului hepatitei epidemice publicată de către *Rightsel* și colab. (11), respectiv de colectivul nostru (5), a fost confirmată și completată în cursul anilor 1961—1970 de numeroși autori după cum reiese din sumarizarea datelor bibliografice a lui *Hersey* și *Shaw* (4). Unele tulpini de virusuri au putut fi considerate drept candidate de virusuri hepatitice, majoritatea lor neîndeplinind însă criteriile pentru a fi incluse în grupa amintită.

Prezența unui antigen — numit Australia (AU) — în serul bolnavilor de hepatită, care după *Zuckerman* (13), respectiv *Gocke* și *Kavey* (3) determină rolul acestui antigen în apariția bolii sau existența unei relații antigenice cu agentul cauzal al hepatitei, a adus o nouă concepție în problema etiologiei hepatitei, obligând cercetătorii să caute explicația cea mai corectă a prezenței antigenului AU-SH.

Deoarece într-o lucrare anterioară cu privire la natura virotică a antigenului AU-SH am arătat că acest antigen se replică în celulele Detroit-6 (VA), ca și virusurile izolate de noi, deci este un virus (6), în lucrarea de față ne-am propus să arătăm rezultatele cercetărilor comparative între antigenul AU-SH și unele tulpini de virusuri izolate de noi.

Material și metodă

1. Antigenul Australia

Antigenul AU-SH l-am obținut de la prof. dr. J. *Zuckerman* din Londra. Cu acest antigen s-au efectuat primele noastre încercări de trecere pe linii de celule.

Un alt antigen numit SH l-am primit de la dr. *Prince* (The New York Blood Center), iar pe al treilea care e plasmă, conținând antigenul AU, de la dr. *Blumberg* (Institute for Cancer Research, Philadelphia, U.S.A.).*

Pentru o orientare mai ușoară, primul antigen a fost denumit de noi AU-SH al doilea AU-Prince, iar al treilea AU-Blumberg.

2. Tulpini de virusuri izolate de noi și folosite în cercetările comparative

Pentru studii comparative am folosit următoarele tulpini de virusuri: V9, V6, 208 și H286. Aceste tulpini — cu excepția tulpinei H286, izolată în 1969 dintr-un caz de hepatită posttransfuzională — au fost studiate de noi în repetate rânduri, ele fiind caracterizate din punct de vedere morfologic, biologic și serologic (7, 8).

3. Cultivarea virusurilor și trecerea antigenelor AU-SH, AU-Prince, AU-Blumberg pe linia de celule Detroit-6 (VA)

* Cu această ocazie ținem să aducem mulțumiri d-lor dr. *Prince* și dr. *Blumberg* pentru amabilitatea cu care ne-au pus la dispoziție antigenul Australia, în vederea cercetărilor.

În toate cazurile am folosit metoda preconizată de noi pentru izolarea virusurilor din cazuri de hepatită (7), mediul de menținere fiind: mediul M 199 cu 2,5% ser agamaglobulinic de vițel și antibiotice (penicilină 100 U/cc, streptomycină 50 gama/cc mediu).

După apariția efectului citopatic (ECP) lichidul supernatant ne-a servit ca antigen pentru reacția de precipitare și pentru efectuarea trecerilor succesive. Celulele, în unele cazuri, au fost folosite pentru cercetări electronmicroscopice

4. Cercetări electronmicroscopice și serologice

Celulele care după infecție au prezentat un ECP transmisibil (fie în prezența virusurilor noastre, fie în urma contactului cu cele trei antigene Australia) au fost fixate, după metoda lui Palade, cu tetroxid de osmiu și incluse în metacrilat de butil și etil (proportia fiind 6:4). Menționăm că, în studiile noastre pentru a obține un contrast mai marcat decât cel cauzat de osmiu, am efectuat o colorare dublă a celulelor cu acetat de urani și acid fosfotungstic.

Secționarea blocurilor s-a efectuat cu ultramicrotomul tip Reichert, iar examinarea secțiunilor cu microscopul electronic tip TESLA BS 242A.

Pentru a compara relațiile antigenice dintre antigenul AU și virusurile noastre am folosit reacția de precipitare a lui Crowle (2). Ca antigen ne-a servit lichidul culturilor de celule inoculate cu antigene sau virusuri, iar ca antiseruri am utilizat: serul 208 și R, respectiv serul AU-SH. Serurile au fost obținute după imunizarea hamsterilor cu virusurile vii, iar serul AU-SH prin imunizarea iepurilor. După 6 săptămâni animalele au fost sacrificate, serurile fiind puse în contact cu celule Detroit-5 (VA) pentru eliminarea anticorpilor anti-om, respectiv a celor care apar față de celulele Detroit-5 (VA). Cercetările de precipitare s-au efectuat în plăci speciale din material plastic, apariția benzilor de precipitare fiind urmărită timp de 2 săptămâni.

Rezultate

1. Rezultatele cultivării virusurilor și a antigenelor Australia pe celule Detroit-6 (VA).

Tulpinele noastre de virusuri V9, V6, 208, H286 cauzează în general între 7—14 zile ECP pe celule Detroit-6 (VA). Această proprietate a tulpinilor nu s-a modificat în cursul trecerilor pe linia Detroit-6 (VA).

Antigenele: AU-SH, AU-Prince, AU-Blumberg cauzează ECP similar cu cel cauzat de virusurile noastre — pe linia preconizată de noi pentru cultivarea virusurilor izolate din hepatită — în primul pasaj după 14 zile, iar în următoarele pasagii după 9—10 zile de la trecerea lor pe celule.

Prin urmare, antigenul Australia se comportă ca un virus, cauzând ECP caracteristic pentru virusurile hepatitice. Acest ECP este însă instabil în sensul că uneori dispare, reapărând în următoarele pasagii. De fapt, acest fenomen l-am descris în lucrări anterioare (9, 10), fiind considerat de noi ca un fenomen de infecție latentă, fenomen cunoscut în virusologie.

Titrul antigenelor Australia care dau un ECP transmisibil, deci DCP₅₀ variază de la 10⁻⁶ și 10⁻³ (deci DCP₅₀ este egal cu 0,2 cc de antigen din diluțiile sus-amintite).

2. Cercetări electronmicroscopice și serologice

A). Cercetări electronmicroscopice

În celulele infectate cu virusuri și antigene pot fi găsite o serie de modificări specifice pentru infecțiile cu virusuri hepatitice și anume:

Citoplasma celulelor este dezintegrată, în sensul că mitocondriile își pierd structura normală ori lipsesc, găsiindu-se doar resturi de mitocondrii. Reticulul endoplasmatic poate fi găsit numai în primul pasaj al antigenului AU-SH, când este foarte abundent și este așezat în interiorul unor vacuole în straturi concentrice sau în cazul tulpinei H 286 în șiruri simetrice.

I. LĂSZLO ȘI COLAB.: STUDII COMPARATIVE ÎNTRE ANTIGENUL AUSTRALIA ȘI VIRUSURILE IZOLATE DE NOI DIN HEPATITE



Fig. nr. 1: Citoplasma unei celule Detroit-6 (VA) după 14 zile de la infectare cu virusul H 286. Apariția unor formațiuni hexagonale cu dimensiuni de cca. 40—80 milimicroni. Mărire: 25.000 X

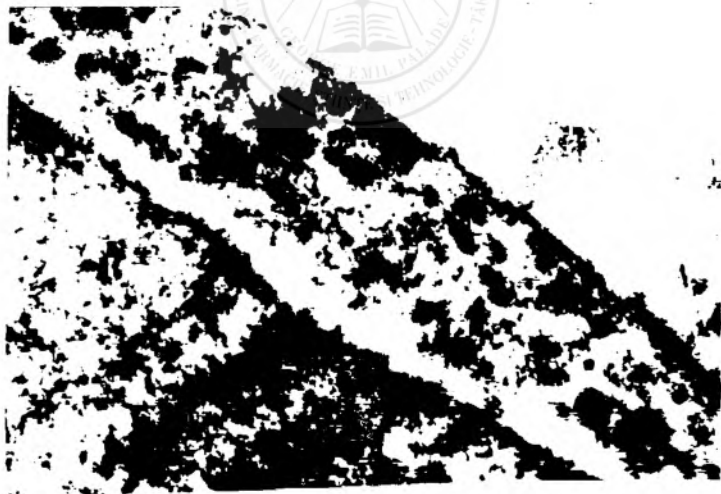


Fig. nr. 2: Apariția unor formațiuni electronoptic dense în citoplasma unei celule, după infecția cu virusul 208. Mărire: 25.000 X



Fig. nr. 3: Prezența particulelor electronoptice dense în citoplasma celulei după infecția cu antigenul AU-Blumberg. Mărire: 25.000 X



Fig. nr. 4: In urma infectiei unei celule cu antigenul AU-prince, apar particule similare virusurilor. Mărire: 25.000 X



Fig. nr. 5: Reacția de imunoprecipitare în agar, după Crowle, aplicând antiserul 208

În legătură cu formațiunile specifice — virusuri — aceste particule se găsesc numai în citoplasmă, avînd o formă hexagonală, cu mijlocul gol, sau particule hexagonale electronoptice dense, probabil compuse din particule mai mici, dimensiunea lor variînd între 40—100 milimicroni.

Aceste formațiuni din punct de vedere morfologic sînt similare, fapt ce pledează pentru identitatea lor.

B). Cercetări serologice

Reacția de precipitare în agar, efectuată după metoda lui *Crowle*, în care s-au folosit ca antigene tulpinile noastre de virusuri și antigenul AU (cele trei antigene AU), cultivate pe celule Detroit-6 (VA) și serurile antivirale 208 și R au dat următoarele rezultate:

În prezența antiserului R, apar benzi de precipitare cu virusurile: V9, AU-Blumberg, AU-Prince, AU-SH și H 286.

În prezența antiserului 208, benzile de precipitare pot fi observate cu ajutorul virusurilor: AU-Blumberg, V9, H 286, AU-SH, AU-Prince, 208.

Antiserul AU-SH cauzează apariția unor benzi de precipitare cu antigenele: 208, H 286, AU-SH, AU-Prince și AU-Blumberg.

Rezultă deci, că serurile noastre specifice pentru diagnosticul serologic al hepatitei epidemice dau reacții de precipitare cu antigenul Australia, cultivat pe celule Detroit-6 (VA).

Discutarea rezultatelor și concluzii

Legat de natura virotică a antigenului Australia prin cercetări electron-microscopice au fost elaborate o serie de lucrări, ca cele ale lui *Almeida* și colab. (1), *Zuckerman* și colab. (13).

În literatura studiată de noi nu am găsit însă date cu privire la trecerea antigenului AU pe culturi de celule, în scopul de a studia cultivabilitatea acestui antigen — presupus de natură virotică. Cercetările electronmicroscopice citate se referă la studiul complexelor de antigen-anticorp, care apare în prezența antigenului AU și a serului de bolnav hepatic.

Lucrarea noastră recent publicată (6), care se ocupă cu studierea naturii virotice a antigenului AU-SH, confirmă că acest antigen este un virus, care se replică în citoplasma celulelor ca și tulpinile de virusuri izolate de noi din hepatită (virusurile 208 și 163 S), fiind din punct de vedere antigenic asemănător cu acestea.

Se ridică problema care este cauza că antigenul AU, ca și virusurile izolate de noi, poate fi foarte greu cultivat pe celule, chiar de proveniență umană.

Păreră noastră este că numai acele linii celulare sînt apte pentru cultivarea virusurilor hepatitice care au o activitate enzimatică foarte intensă — cum ar fi linia Detroit-6 (VA) (12). Menționăm însă că, virusurile izolate de noi deseori nu dau ECP apreciabil, din cauza instalării unei infecții latente a celulelor care îngreunează stabilirea prezenței virusurilor.

Studiile noastre comparative — cele morfologice și serologice — arată că, antigenul Australia (AU-SH, AU-Prince și AU-Blumberg) este identic cu virusurile izolate de noi. Prin urmare acest antigen sau antigene sînt virusuri, care se multiplică în aceleași condiții ca și tulpinile noastre. Se pare că diferențele, privind mărimea în cadrul aceleași tulpini sau antigene, se datoresc formării unor complexe mai mari de virusuri, fenomen de fapt semnalat încă în prima noastră lucrare (5).

Deși prezența antigenului Australia în serul sau plasma bolnavilor de hepatită pledează pentru rolul acestuia în etiologia bolii, sau pentru o strînsă relație cu adevăratul agent cauzal al bolii, sînt încă necesare studii complexe, dintre care reproducerea hepatitei experimentale — pe animale — care pot completa rezultatele obținute pînă în prezent

Concluzii

1. În urma comparării transmisibilității pe linia Detroit-6 (VA) a antigenului Australia și a tulpinilor de virusuri izolate de noi, am putut stabili că acestea se multiplică în mod identic, cauzând un efect citopatic identic.

2. Morfologia antigenului Australia, trecut pe linia de celulă Detroit-6 (VA), este identică cu cea a tulpinilor de virusuri izolate de noi.

3. Experiențele de imunoprecipitare, aplicând seruri specifice preparate față de tulpinile noastre de virusuri și antigenul Australia, au putut confirma identitatea serologică dintre acestea.

Sosit la redacție: 10 iulie, 1970

Bibliografie

1. ALMEIDA J. D., ZUCKERMAN A. J., TAYLOR P. E., WATERSON A. P.: *Microbios* (1969), 2, 117; 2. CROWLE A. J.: *J. Lab. Clin. Med.* (1960), 55, 593; 3. GOCKE D. J., KAVEY N. B.: *Lancet* (1969), 1, 7605, 1055; 4. HERSEY D. F., SHAW E. D.: *Lab. Investigation* (1968), 19, 5, 558; 5. LÁSZLÓ J., PÉTER M., FILEP GY., ÁBRAHÁM S., BÁLINT E., PAÁL GYÖRGYI, DOMOKOS L., KASZA L., BEDŐS.: *Rev. Med.* (1962), 1, 8, 45; 6. LÁSZLÓ I., KASZA L., SANDA MUNTEANU, FILEP V.: *Rev. Med.* (1970), 16, 2, 165; 7. LÁSZLÓ I., PÉTER M., FILEP V., BÁLINT E., ÁBRAHÁM AL., IZSÁK A., ALMÁSI SUSANA, SABAU MONICA, KASZA K.: *Rev. Med.* (1964), 10, 3, 280; 8. LÁSZLÓ I.: *Rev. roum. d'inframicrobiol.* (1969), 6, 4, 263; 9. LÁSZLÓ I.: *Rev. Med.* (1966), 12, 2, 176; 10. LÁSZLÓ I., MUNTEANU SANDA, BOTH IULIANA, SEBE B., FILEP V., ALMÁSI SUSANA: *Rev. Med.* (1967), 13, 3—4, 266; 11. RIGHTSEL W. A., KELTSH R. A., TAYLOR A. R., BOGGS J. D., McLEAN J. W. JR.: *J. A. M. A.* (1961), 177, 671; 12. WIENER F., SEBE B., LÁSZLÓ J., SZÉKELY K.: *Acta biol. med. germ.* (1968), 21, 571; 13. ZUCKERMAN A. J.: *Nature* (1969), 223, 569