

INFECȚIA LATENTĂ A LINIEI DE CELULE DETROIT-6(VA) CU VIRUSURI IZOLATE DE LA BOLNAVI DE HEPATITĂ EPIDEMICĂ

dr. I. László, V. Filep, dr. Sanda P. Muntean, Iuliana Both

Prin infecția latentă a celulelor, cauzată de un anumit virus, se înțelege evoluția infecției fără manifestări morfologice sau biochimice evidente, datorită stabilirii unui echilibru între celula gazdă și parazit.

Dintre infecțiile latente pot fi amintite cele ale plantelor, artropodelor (infecția căpușelor cu virusul encefalitei de primăvară-vară) și ale șoarecilor (cu virusul coriomeningitei limfocitare sau cu virusul ectromeliei).

În cadrul virozelor umane un exemplu clasic al infecțiilor latente este cel cu virusul herpetic. Este cunoscut faptul că sub acțiunea factorilor fizici, chimici sau în urma unor tulburări digestive, virusul herpetic latent este reactivat, declanșând erupțiile herpetice tipice. Un alt exemplu din domeniul infecțiilor latente este infecția celulelor cu adenovirusuri. Din datele bibliografice ale lui Nász, Béládi și Lengyel (1), precum și din cercetările noastre, reiese că în urma prelucrării țesutului adenoidal după tonsilectomie, prezența adenovirusurilor variază între 26—60 %; infecția latentă cu adenovirusuri variază și în funcție de vîrstă, fiind mai frecventă sub 10 ani (33 %), decît peste 19 ani (6 %).

Nici pînă în prezent nu s-a putut stabili în mod cert dacă virusurile latente se găsesc în organism în formă de virion inactiv, sau ADN-ul viral este integrat în genomul celulei gazde. Pentru virusurile de tip ADN această formă de existență în celule este posibilă. În orice caz, în momentul dispariției echilibrului dintre virus și celula gazdă, devine posibilă replicarea virusului respectiv cauzînd alterări apreciabile în celulele parazitare.

În ultimele două decenii, prin izolarea unor agenți transmisibili din produsele patologice ale bolnavilor suferind de hepatită, prin descoperirea antigenului Australia (AU), au fost aduse contribuții importante la elucidarea unor aspecte ale patogeniei bolii, însă concepțiile privind natura și caracterele virusurilor hepatice sînt contradictorii.

Cauzele divergențelor de păreri în legătură cu virusul hepatitei au fost deseori analizate, arătîndu-se că dintre acestea cea mai importantă este lipsa reproductibilității cercetărilor și cultivării constante a acestor virusuri, atît pe linii celulare cit și pe celule primare de origine umană.

Deoarece încă în prima etapă a cercetărilor noastre, legate de etiologia hepatitei epidemice (HE), am constat că în rîndul persoanelor sănătoase în cca 5—30 % a cazurilor pot fi găsiți indivizi la care reacția de fixare a complementului (RFC) efectuată cu tulpini de virus izolate de noi este pozitivă, am considerat că uneori hepatita poate să evolueze în formă inaparentă, fără modificări biochimice, însă cu un răspuns imunologic pozitiv.

Tot în această etapă am observat că virusurile izolate de noi — care din punct de vedere morfologic sînt identice cu cele descrise de *Rightsel* și colab. — sînt virusuri foarte mici (15 milimicroni), care prin agregare dau naștere la apariția formelor complexe de 70 milimicroni, produc un efect citopatic instabil, îngreunînd astfel aprecierea replicării lor. Avînd în vedere că, în urma trecerii tulpinilor de virusuri adaptate la liniile celulare, pe celule primare de embrion uman, reapare efectul citopatic (ECP), am presupus că acest fenomen este cauzat de trecerea virusului din formă latentă în formă infectivă.

DETROIT-6(VA) CU VIRUSURI IZOLATE DE LA BOLNAVI
DE HEPATITA EPIDEMICA



Fig. nr. 1: Celulă Detroit-6(VA). Infecție dublă cu adenovirus tip 3 și cu virusul hepatic B. Ambele virusuri sînt prezente în citoplasmă și în nucleu (AD = adenovirus tip 3; R = virusul hepatic). Mărire: 60 000 X

Scopul acestei lucrări este studierea fenomenului de infecție latentă, cauzat de virusurile hepatitice și a unor aspecte care condiționează reproducerea acestor virusuri.

Material și metodă

Deși metodele preconizate de noi pentru izolarea virusurilor au fost publicate (2 și 3), menționăm că am folosit o linie de celule hipertetraploidă, obținută de noi în urma cultivării liniei originale Detroit-6, în prezența mediilor M 199 și Hanks, îmbogățite cu mesoinsolitol. Această linie nouă este caracterizată printr-o activitate succinodhidrazică foarte marcată față de linia originală și a fost denumită de noi Detroit-6 (VA) (4), D-6 (VA).

Pentru infecția liniei sus-amintite a fost utilizat lichidul supernatant al culturilor, în prealabil inoculat cu virusurile R, V/9, V 6, 163S, 208, 258 etc. izolate de noi. După trecerea suspensiei virale pe celule Detroit-6 (VA), flacoanele cu culturi au fost menținute la 37° C timp de 14 zile, controlul reproducerii virusurilor efectuându-se zilnic.

În cazurile în care efectul citopatic nu a apărut, supernatantul celulelor a fost trecut pe celule embrionare umane obținute prin tripsinizare, iar ulterior, după 7—14 zile, atît celulele care prezentau semne de alterare, cît și celulele fără ECP au fost fixate după metoda lui *Palade* și incluse în amestec de metacrilat sau Vestopal W. După ultrasecționare, am examinat secțiunile cu ajutorul microscopului electronic TESLA BS 242 A.

Pentru „reactivarea” virusurilor hepatitice „inactive” sau integrate în celule am aplicat metoda infecției simultane a celulelor cu virusul HE și adenovirusul tip 3. În acest scop am folosit ca tulpini de virus hepatitic virusul R izolat în 1962 și tulpina 208 izolată în 1966. DCP₅₀ pentru ambele tulpini a fost 0,2 ml din diluția 10⁻⁶.

Celulele D-6 (VA) au fost inoculate cu adenovirusul tip 3, (5 ml de suspensie virală la 150 ml mediu M 199 cu ser agamaglobulinic de vițel 2%). După 48 de ore celulele au fost spălate cu tampon Dulbecco și suprainfectate cu 5 ml suspensie de virus R, respectiv 208.

Am urmărit apariția ECP și cînd majoritatea celulelor au prezentat semne de alterare, acestea au fost fixate și prelucrate pentru examinări electronmicroscopice.

Rezultate

1. — Scăderea ECP cauzată de virusurile hepatitice pe cea mai sensibilă linie celulară folosită de noi — D—6(VA) — nu este un fenomen general, deși poate fi constatată foarte frecvent. Chiar în acele cazuri în care ECP lipsește, lichidul supernatant al acestor celule trecut pe celule embrionare umane, declanșează un ECP apreciabil. Comportarea tulpinii 258 am studiat-o pînă la al 14-lea pasaj, a virusului V 9 pînă la al 62-lea pasaj, a tulpinii 208 am studiat-o în 51, iar tulpina R în 91 de pasaje.

Urmărind cu atenție influența metodei diluțiilor de virusuri asupra gradului ECP, am observat că suspensia virală diluată dă un ECP apreciabil. În acest caz poate fi vorba de eliminarea fenomenului de autointerferență dintre particulele virale defective și mature. Scăderea ECP este strîns legată de temperatura și pH-ul mediului. Virusurile izolate de noi nu se dezvoltă sub 36° și la un pH sub 7,2 (pH-ul optim fiind 7,6—7,8).

O altă constatare privind infecția latentă a celulelor este că vîrsta culturii poate fi un factor apreciabil, în sensul că numai celulele tinere (între 1—3 zile) arată o receptivitate față de virus, deci acele celule care au un metabolism intensiv. Linia D—6(VA), cu o activitate succinodhidrazică in-

tensă — care la celulele tinere este și mai marcată — arată susceptibilitate față de infecția cu virusurile hepatitice.

2. — Cercetările electronmicroscopice ale celulelor infectate, fără ECP evident, ne arată următoarele: nucleul celular are un aspect normal, eventual apare o așezare marginală a cromatinei în lungul membranei nucleare. În citoplasmă însă, apar acumulări de granule fine, electronoptic dense, care seamănă cu incluziunile sau au aspect de „viroplasmă“. În jurul acestora, uneori apar formațiuni asemănătoare virusurilor (hexagonale sau inelare). Particulele mici, sferice, în general variază între 15—18 milimicroni, iar cele hexagonale între 70—90 milimicroni. Noi am considerat că particulele mari derivă din aglomerarea celor mici, care sînt defective și pot imprima celulelor numai o infecție latentă.

3. — Aplicarea metodei de dublă infecție a liniei celulare cu un virus auxiliar (complementar), cum ar fi adenovirusul și cu un virus hepatitic defectiv (de exemplu virusul R sau 208) ne-a permis observarea următoarelor fenomene:

— adenovirusul tip 3, cu care s-a făcut infectarea prealabilă a celulelor D—6(VA), schimbă metabolismul acestora și favorizează reproducerea virusurilor hepatitice defective. Imaginile electronoptice arată că și adenovirusul și virusul hepatitic se replică intens atât în nucleu cît și în citoplasmă (vezi figura), ceea ce nu poate fi văzut în cazul infecțiilor separate.

Prin urmare, virusurile hepatitice defective pentru replicare au nevoie de un virus auxiliar. În cazul lipsei acestuia apare infecția latentă a celulelor.

Concluzii

1. — Virusurile HE și ale hepatitei serice se replică în mod analog în celulele receptive; majoritatea acestor virusuri se adaptează la celule, fapt care se poate demonstra numai prin studii electronoptice.

2. — Reproducerea acestor virusuri — care după părerea noastră sînt virusuri defective — este foarte lentă (eventual datorită fenomenului de autointerferență). În prima fază a replicării crește acumularea granulelor de ribonucleoproteine, care deseori corespunde unei incluziuni sau are aspectul viroplasmiei. În jurul acestor granule apar formațiunile virale complexe — hexagonale sau inelare.

Ceea ce pledează pentru infecția latentă este că examenele histologice nu arată modificări, existența virionilor în celule fiind determinată numai prin microscopie electronică sau prin metode histochemice.

3. — Virusurile hepatitice defective care imprimă o infecție latentă celulelor, se replică intens numai în prezența unui virus auxiliar (helper-virus). În acest caz, ECP devine intens și apreciabil.

Sosit la redacție: 12 ianuarie 1972.

Bibliografie

1. NÁSZ J., BÉLÁDI ILONA, LENGYEL ANNA: Az adenovírusok és kórokozó szerepük, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1967; 2. J. LÁSZLÓ, E. BÁLINT, V. FILEP M. PÉTER, A. ÁBRAHÁM, SUSANA ALMÁSI: Nature (1965), 207, 326; 3. J. LÁSZLÓ: Rev. Roum. d'Inframicrobiol. (1969), 6, 4, 263; 4. F. WIENER, B. SEBE, J. LÁSZLÓ, C. SZÉKELY: Acta Biol. Med. Germ. (1968), 21, 571.