

INCIDENȚA ANTICORPILOR NEUTRALIZANȚI FAȚĂ DE VIRUSUL IZOLAT DIN LEUCEMIE UMANĂ LA INDIVIZII SĂNĂTOȘI ȘI LA BOLNAVII DE LEUCEMIE

dr. P. Soós, dr. I. László, dr. Sanda Munteanu, V. Filep

În literatura de specialitate numeroase lucrări subliniază rolul unor agenți virali în etiologia leucemiilor umane.

Scopul lucrării de față a fost studierea incidenței anticorpilor neutralizanți din serul bolnavilor de leucemie și al indivizilor sănătoși.

Material și metodă

I. Reacția de seroneutralizare

Deoarece, reacția de seroneutralizare (RSN) este cea mai specifică probă dintre toate reacțiile serologice aplicate pentru identificarea infecțiilor virotice, în cercetările noastre, în special privind doza virusului folosit în reacție, am utilizat cu unele mici modificări tehnica descrisă de *Cajal* (2).

1. Tulpina de virus

În cercetările noastre tulpina de virus 846 izolată de *Nastac* și colab. (9) ne-a servit ca presupus agent al leucemiei umane. Caracterele de cultivabilitate ale acestei tulpini au fost studiate de *László* și *Filep* (6). Acest virus izolat de *Nastac* de la un bolnav de leucemie, pare a fi ori un agent transmisibil găsit în leucemie, ori din punct de vedere antigenic un virus înrudit cu agentul leucemiei.

Virusul 846 se dezvoltă extrem de greu pe culturi de celule, astfel pe linia Detroit-6 (VA) efectul citopatic (ECP) dispare după al 2-lea pasaj, iar pe celule de rinichi de maimuță R₁CA dă un ECP în focare. După *László* și *Filep* (6) proprietățile morfologice ale acestor particule seamănă cu cele ale virusurilor variolo-vacinei (vezi fig. nr. 1).

Doza de virus folosită în RSN a fost de 100 DCP₅₀ — adică de 0,2 cc din diluația de 1/100 a suspensiei virotice.

2. Lina de celule

Pentru reacția de seroneutralizare am folosit numai linia R₁CA. Mediul de menținere pentru acest virus a fost cel preconizat de Catedra de microbiologie a I.M.F. Tirgu Mureș: mediul M.199 cu 2,5 % ser agamaglobulinic de vițel (preparat de Inst. Dr. I. Cantacuzino) și antibiotice — penicilină 100 U'cc, streptomycină 50 gamma/cc.

II. Reacția de precipitare în agar și reacția de dublă difuziune în agar.

Reacția de precipitare în agar s-a efectuat după metoda lui *Crowle* (3). În acest scop am utilizat plăci din material plastic, care permit citirea ușoară a apariției bandei de precipitare. Plăcile după așezarea antigenului și a serurilor în godeuri, au fost menținute la 32°, timp de 2 săptămâni, după care am citit rezultatele.

În cadrul metodei de dublă difuziune în agar — descrisă de *Parlett* și colab. (12) — am folosit tuburi sterile subțiri din sticlă de Jena; cele două straturi de geloză (de 1 % și 0,5 %) conținând tiomersal în concentrație finală de 1/10.000. Având în vedere că în cazul infecțiilor virale cantitatea anticorpilor precipitanți

adeseori este prea mică, tuburile au fost menținute timp de două săptămâni la termostaț și numai după acest timp s-a făcut citirea definitivă a rezultatelor.

III. Seruri.

În cursul cercetărilor noastre am examinat în total 50 de seruri. Dintre acestea 31 seruri au fost recoltate de la bolnavi cu diagnosticul de leucemie, iar 19 au fost obținute de la indivizi sănătoși — donatori de sînge — de la Stația de recoltare și conservare a sîngelui din Tîrgu Mureș.

Din cele 31 de seruri recoltate de la leucemici reacția de seroneutralizare s-a efectuat în 13 cazuri, metoda de precipitare după Crowle în 20 de cazuri, iar reacția de dublă difuziune în agar în 4 cazuri.

Din 19 seruri — recoltate de la sănătoși — proba lui Crowle a fost aplicată în 12 cazuri, iar reacția lui Parlett în 7 cazuri.

IV. Modificări în reacția de precipitare.

În cursul efectuării probei de precipitare a apărut un fenomen interesant, și anume formarea unei benzi de precipitare, între două seruri de proveniență umană (seruri de la bolnavi de leucemie). Acest aspect nou ne-a obligat să încercăm studierea fenomenului prin „încercări de izolare” a antigenului-viral (?) și folosirea acestui „antigen-leucemic” în reacția de precipitare.

Din motivul amintit, din 16 seruri — obținute de la bolnavi de leucemie — am încercat izolarea unui antigen „viral”, după metoda uzuală de izolare a virusurilor, folosind celule Detroit-6 (VA).

V. Cercetări electronmicroscopice.

După o cultivare de 7—10 zile, acele culturi de celule care din punct de vedere morfologic au arătat alterări, au fost fixate după metoda lui Palade cu tetroxid de osmiu și incluse în metacrilat de butil și etil (6:4), apoi secționare cu ultramicrotomul Reichert și examinate cu microscopul electronic de masă tip TESLA BS 242 A.

Rezultate

I. Reacția de seroneutralizare.

În trei cazuri, din cele 13 seruri cercetate, n-am găsit anticorpi neutralizanți ai virusului 846. Variația titrului anticorpilor reiese din tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

| Virus | Titrul anticorpilor neutralizanți (numărul absolut al cazurilor) | | | | | Total |
|------------------------------|---|------|-------|-------|--------|-------|
| | 1/10 | 1/50 | 1/100 | 1/320 | Dubios | |
| 846 100 DCP ₅₀ | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 10 |

Se pare — după cum arată și rezultatele de mai sus — că la unii bolnavi de leucemie umană apar anticorpi neutralizanți față de tulpina izolată de *Nastac*. Acest fapt pledează pentru rolul etiologic al agentului izolat în leucemiile umane, sau pentru existența unei înrudiri antigenice dintre acest virus și agentul cauzal al leucemiilor umane.

II. Rezultatele reacției de precipitare în agar.

a) Reacția efectuată după metoda lui Crowle.

Din 31 de seruri recoltate de la bolnavi de leucemie, 20 au fost testate

după metoda menționată, în prezența antigenului 846, iar 24 în prezența antigenului L₃₀₀, respectiv AB — obținute de noi cu ocazia încercărilor de izolare a virusului din leucemie. În fiecare seria au fost introduse și seruri martori (recoltate de la persoane sănătoase).

Rezultatele obținute sînt cuprinse în tabelul nr. 2.

Tabelul nr. 2

| Antigen | Seruri recoltate de la persoane | | | |
|------------------|---------------------------------|---------|-----------|---------|
| | leucemie | | sănătoase | |
| | pozitiv | negativ | pozitiv | negativ |
| 846 | 0 | 20 | 0 | 12 |
| L ₃₀₀ | 0 | 12 | 1 | 23 |
| AB | 0 | 12 | 0 | 12 |

Din acest tabel reiese că în prezența antigenelor utilizate nici un ser leucemic nu dă reacția de precipitare, dar la un ser provenit de la un individ sănătos am observat apariția unei benzi de precipitare.

Un fenomen interesant s-a constatat cu ocazia efectuării acestor probe, anume apariția unor benzi de precipitare între unele seruri folosite în reacție. Astfel, s-a constatat apariția precipitatului între următoarele seruri: L₃₀₀ și L₃₀₁ și L₂₉₉ (fig. nr. 2), L₁₄ și L₃₀ (fig. nr. 3), L₂₉₈ și L₂₈₅, L₂₉₈ și L₂₈₈, L₃₀₈, L₂₈₅, L₃₀₈ și L₂₈₈. Deoarece în aceste cazuri precipitatul este rezultatul combinării antigenului cu anticorpii, unele seruri trebuie considerate „antigene“ iar altele care conțin anticorpi.

b) Rezultatele reacției de dublă difuziune în agar.

Proba s-a efectuat cu 4 seruri recoltate de la bolnavi și cu 12 de la persoane sănătoase. Din 4 seruri obținute de la bolnavi, în trei cazuri a apărut banda de precipitare, însă în prezența serurilor recoltate de la persoane sănătoase precipitarea a fost absentă. Această reacție pare mai sensibilă decît cea a lui Crowle.

III. Compararea rezultatelor obținute prin reacția de seroneutralizare cu cele din reacțiile de precipitare.

În materialul nostru numai în cinci cazuri am putut confrunta rezultatele reacției de seroneutralizare cu cele de precipitare, din care în patru cazuri atît RSN cît și reacția de precipitare au dat rezultate pozitive. Aceste date confirmă valoarea probelor utilizate, precum și înrudirea antigenică dintre agentul lui Nastac și agentul transmisibil găsit și de noi în unele seruri leucemice.

După metoda preconizată de Catedra de microbiologie, am încercat din 16 seruri leucemice izolarea unui agent transmisibil.

Dacă după 10 zile a apărut ECP pe linia de celule Detroit-6 (VA), am efectuat un al doilea pasaj pentru verificarea transmisibilității în seria a ECP. Din 16 seruri numai în trei cazuri am găsit că ECP poate fi transmis și după al doilea pasaj, și anume la serurile: L₁₄, L₂₉₈ și L₃₀₀. Culturile infectate cu aceste seruri — adică „antigene leucemice“ — au fost studiate de noi electronmicroscopic.

V. Cercetări electronmicroscopice.

Celulele de tip Detroit-6 (VA) arată în toate cazurile o alterare profundă a citoplasmei, vacuolizare și dezintegrarea reticulului endoplasmatic. Mitocondriile sînt pe alocuri umflate, dar în majoritatea cazurilor se găsesc doar resturi de mitocondrii. Se constată totodată o acumulare de particule în citoplasma celulelor, care sînt asemănătoare virusurilor („virus-like particles“) (fig. nr. 4).

Aceste particule nu au nici dimensiunea, nici structura virusurilor izolate de *Nastac* și colab. (9) și studiate de *László* și *Filep* (6). Aceste formațiuni par a avea însă o oarecare specificitate în sensul că în prezența lor unele seruri, recoltate de la bolnavi de leucemie, dau o bandă de precipitare, ceea ce denotă caracterul specific al particulelor găsite în culturile de celule infectate cu serurile leucemice amintite.

Discutarea rezultatelor

Numeroși autori, ca *Magrassi* și colab. (7), *Murphy* și colab. (8), *Negróni* (11), *Dmochowski* (4), *Burger* (1), *Graffi* și colab. (5), *Nastac* și colab. (10) au demonstrat, că este posibilă izolarea unor agenți transmisibili din produsele patologice ale bolnavilor leucemici sau pot fi izolate particule similare virusurilor. Lipsa unor cercetări complexe în confirmarea acestor date, îngreunează însă mult stabilirea certă a rolului virusurilor în etiologia bolii.

Din motivele amintite, în lucrarea de față am încercat să arătăm necesitatea studierii problemei prin introducerea unor cercetări complexe, cum ar fi cele imunologice, chiar dacă în literatura de specialitate studiată nu am găsit date concrete.

1. Rezultatele cercetărilor de seroneutralizare arată că din 13 seruri recoltate de la bolnavi, în 10 am găsit anticorpi neutralizanți față de virusul izolat de *Nastac*. Aceste rezultate ne confirmă în primul rînd justa noastră orientare spre căutarea unor anticorpi în leucemie, pe de altă parte subliniază rolul etiologic al virusului 846, sau înrudirea antigenică dintre acest virus și agentul causal al leucemiilor umane.

Dat fiind că reacția de seroneutralizare — în diagnosticul bolilor infecțioase de natură virotică — este reacția cea mai specifică, considerăm că modestele noastre rezultate aduc un aspect nou în studierea etiologiei leucemiilor umane.

2. Reacția de precipitare în agar (efectuată după metoda lui Crowle, respectiv după *Parlett* și colab.), deși este o metodă din ce în ce mai mult utilizată în cercetările imunologice, nu ne-a furnizat rezultate convingătoare în cazul antigenului lui *Nastac* sau a celor două antigene obținute de noi (L_{300} și AB).

Aplicînd metoda lui *Crowle* la nici un bolnav de leucemie nu am găsit anticorpi precipitanți față de virusurile amintite, după reacția de dublă difuziune în agar însă, din 4 cazuri la 3 a dat o bandă de precipitare față de antigenul 846. Pentru cercetările din viitor recomandăm aplicarea acestei metode de precipitare în locul probei lui *Crowle*.

Pînă în prezent nu am găsit nici o explicație prezenței anticorpilor precipitanți față de tulpina 846 la un individ sănătos.

Faptul, că între unele seruri a apărut o zonă de precipitare foarte netă, ne-a obligat să extindem experiențele noastre spre a găsi o explicație acestui fenomen. Aplicînd metoda de cultivare a virusurilor, am reușit să stabilim că serurile în prezența cărora apare banda de precipitare conțin un „agent transmisibil“, asemănător virusurilor, dar care nu are o morfologie identică cu acele particule care au fost izolate de autorii citați în introducerea acestui capitol. Totuși, se pare că în cazurile în care în prezența „antigenelor“ (serurile L_{300} , L_{298} și L_{14}) a apărut reacția de precipitare este vorba de o reacție specifică, deci combinarea unui antigen

P. SOOS ȘI COLAB.: INCIDENȚA ANTICORPILOR NEUTRALIZANȚI FAȚĂ DE VIRUSUL IZOLAT DIN LEUCEMIE UMANĂ LA INDIVIZII SĂNĂTOȘI ȘI LA BOLNAVI DE LEUCEMIE

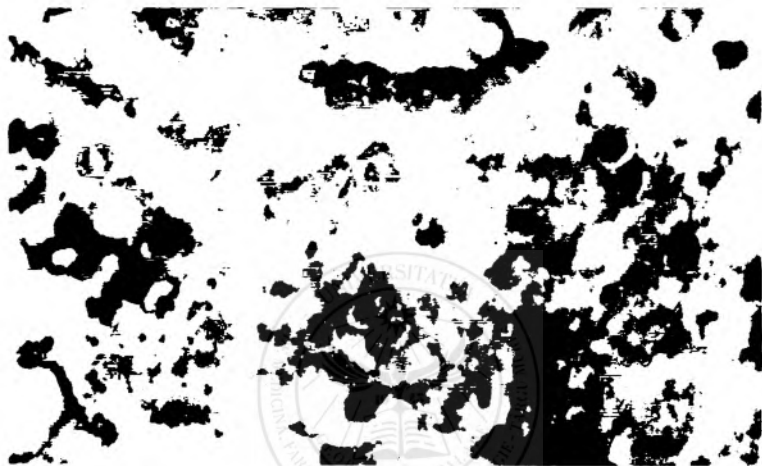


Fig. nr. 1: Virusul 846 în citoplasma celulei R₁CA. Mărire: 25000 X



Fig. nr. 2: Apariția unor benzi de precipitare între serurile unor bolnavi de leucemie

P. SOÓS ŞI COLAB.: INCIDENŢA ANTICORPILOR NEUTRALIZANŢI FAŢĂ DE VIRUSUL IZOLAT DIN LEUCEMIE UMANĂ LA INDIVIZII SĂNĂTOŞI ŞI LA BOLNAVI DE LEUCEMIE

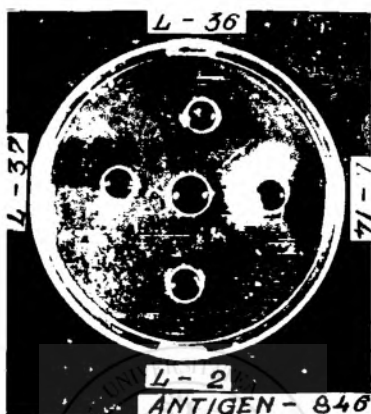


Fig. nr. 3: Apariția unei bande de precipitare între serurile L 36 și L 14, recoltate de la bolnavi de leucemie. Absența fenomenului de precipitare în prezența antigenului 846 și serurile obținute de la bolnavi

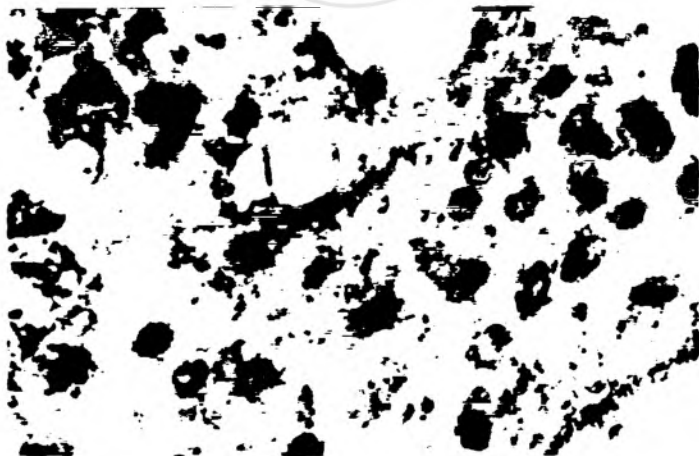


Fig. nr. 4: Particule asemănătoare virusurilor în citoplasma celulei Detroit-6 (VA). Mărire: 25000 X

cu anticorpii respectiv. Aceste rezultate arată totodată că în serul unor persoane bolnave cantitatea „antigenului leucemic” sau a agentului transmisibil este mare, pe de altă parte impune concentrarea virusurilor izolate, în special a tulpinei 846, care cu ocazia replicării sale produce puține particule virale. Considerăm că folosirea unui antigen concentrat în reacția lui Crowle va modifica în sens pozitiv rezultatele cercetărilor.

Concluzii

1. Agentul transmisibil — virusul 846 — izolat de *Nastac* și colab. are înrudiți antigenice cu agentul cauzal al leuceimilor umane, față de care în unele cazuri apar anticorpi *neutralizanți* și *precipitanți*.

2. Organismul bolnavilor de leucemie — ca semn de apărare — este capabil să producă anticorpi specifici față de agenții transmisibili, izolați din cazuri de leucemie, deși nu am putut stabili în mod cert rolul acestora din urmă în etiologia bolii.

3. Din rezultatele reacțiilor de precipitare reiese că unele seruri se comportă ca antigene, dînd și un efect citopatic pe liniile de celule. Studiarea acestor antigene merită toată atenția cercetătorilor care se ocupă de etiologia leuceimilor umane.

Sosit la redacție: 2 iulie 1971.

Bibliografie

- BURGER C., HARRIS W., ANDERSON, BARLETT T. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. (1964), 115, 151; 2. CAJAL N.: Diagnosticul de laborator al inframicrobiotezelor umane. Ed. Acad. R.P.R., București, 1958; 3. CROWLE A. J.: J. Lab. Clin. Med. (1960), 55, 593; 4. DMOCHOWSKI L.: Cancer. Res. (1960), 20, 77; 5. GRAFFI A., SCHRAMM T., FORSTER W.: Rev. Roum. d'inframicrobiol. (1967), 4, 1, 53; 6. LASZLÓ I., FILEP G.: Rev. Med. (1969), 15, 4, 434; 7. MAGRASSI cit. NICOLAU ȘT. S., NASTAC ELISABETA: Virusuri și tumori, Ed. Acad. R.S.R., București, 1968; 8. MURPHY W. H., FURTADO D., PLATA E.: J.A.M.A. (1964), 188, 439; 9. NASTAC ELISABETA, FUHRER-ANAGNOSTE B., TARCHILA D.: Stud. și cercet. de inframicrobiol. (1961), 12, 3, 359; 10. NASTAC ELISABETA, PETRESCU A., LUNGU MICHAELA, STOIAN M., PACURARE EVA: Rev. Roum. d'inframicrobiol. (1966), 3, 2, 155; 11. NEGRONI G.: Brit. Med. J. (1964), 1, 927; 12. PARLETT R. C., YOUMANS G. P., REHR C., LESTER W.: Amer. Rev. T.B.C. (1958), 77, 462.