

HEPATITA VIRALĂ EXPERIMENTALĂ LA HAMSTERI

dr. I. László, Iuliana Both, V. Filep

Primele încercări de transmitere a hepatitei virale la animale de experiență sînt legate de numele lui *Andersen și Tulinius* (1), care în 1938 transmit boala la porci. *Nicolau și colab.* (17) în 1943 demonstrează apariția incluziilor nucleare în celulele hepatice ale unor animale infectate cu produsele patologice ale bolnavilor suferind de hepatită, modificările histopatologice fiind analoge cu cele găsite la om.

Aceste observații au putut fi confirmate numai în parte (*Terskih* 19, *Dick și colab.* 6), alții ca *Primavesi și Stöcker* (18) ajung la rezultate negative.

Începînd cu anul 1959, în literatura de specialitate apar din nou numeroase articole legate de reproducerea experimentală a hepatitei. Astfel, *Kubelka și colab.* (8) prin inocularea lichidului culturilor de celule infectate cu serul unor bolnavi de hepatită, produc la șoareci hepatită letală. Cercetătorii japonezi *Arakawa și colab.* (2) au reușit să adapteze virusurile hepatice la creier de șoarece.

În anul 1961 în laboratorul nostru am reușit reproducerea unor modificări similare cu cele observate în hepatita umană, la hamsterii care au fost inoculați intrahepatic (i. h.) cu produsele patologice ale bolnavilor de hepatită (9), confirmînd astfel observațiile lui *Wildführ* (20) cu privire la receptivitatea hamsterului față de virusul hepatitei umane.

Descrierea izbucnirii epidemiei de hepatită umană de către *Hillis* (7) în rîndul persoanelor care în mod direct s-au ocupat cu cimpanzei, a adus argumente convingătoare privind existența purtătorilor de virusuri hepatice printre simiene. La fel de interesante sînt experiențele lui *Deinhardt și colab.* (4), care transmit hepatita umană la o maimuță sudamericană (*Sanguinus oedipomidas*). Autorii constată creșterea valorilor enzimatică (SGOT) și apariția unor leziuni similare cu cele descrise în boala umană, deși tulpina *Barker* folosită de ei, după *Parks și colaboratorii*, nu corespunde întocmai virusului hepatitei umane.

Pe lîngă cele sus-amintite, a mai fost semnalată de către *Bertók* (3) receptivitatea cobailor tratați în prealabil cu etionină față de virusul hepatitei, însă rezultatele semnalate au putut fi confirmate numai parțial și de alții.

Prin urmare hepatita virală experimentală — reprodusă cu produsele patologice ale bolnavilor sau cu agenți transmisibili izolați de la bolnavi — este și astăzi discutabilă, neavînd un animal destul de receptiv la infecție.

Primele noastre cercetări legate de transmiterea hepatitei la hamsteri au fost efectuate în 1957, iar rezultatele prezentate în 1961 (9). În urma evaluării acestor rezultate am ajuns la concluzia că, hamsterul (*Cricetus auratus*) poate fi folosit ca model pentru studierea hepatitei umane.

Dat fiind că receptivitatea hamsterilor nu este un fenomen general, fiind probabil condiționată nu numai de organismul gazdă dar și de caracterele defective ale virusurilor hepatitei umane, în lucrarea de față dorim să ne ocupăm mai mult de factorii care favorizează pe cale experimentală apariția hepatitei la hamster.

Material și metodă

1. În cursul cercetărilor efectuate între anii 1957—1971 s-au folosit hamsteri de cca 100—125 g, obținuți de la Biobaza I.M.F. Tirgu Mureș, animalele fiind ținute la un regim obișnuit. În total s-au folosit 571 de hamsteri.

2. Inoculările hamsterilor s-au efectuat pe cale intrahepatică (i. h.) 0,1 cc, intraperitoneală (i. p.) 0,2 sau 0,5 cc. Infectarea s-a efectuat cu produsele patologice ale bolnavilor (ser, singe, filtrat de materii fecale, suc duodenal), cu virusuri izolate de la bolnavi de hepatită (tulpinile R, V9, V6, 163, 208, 250, 286 etc.) și cu virusuri obținute prin cultivarea adenovirusului tip 3 cu o tulpină de virus hepatitic (13).

Virusurile din punct de vedere morfologic și serologic au fost studiate în mod detaliat (11), ele neputând fi incluse în grupa virusurilor cunoscute (15).

3. Cercetările au fost efectuate în vederea:

- studierii modificărilor histopatologice și ultrastructurale ale ficatului;
- studierii proprietăților imunogene ale virusurilor hepatitice formolizate.

Metodele aplicate în cursul cercetărilor histopatologice și de ultrastructură au fost publicate în lucrările noastre anterioare (10, 13, 14, 15).

Rezultate

I. La 76 de hamsteri inoculați cu ser provenit de la bolnavi de hepatită la 62,5% apar alterări în ficat, cu disocierea trabeculelor hepatice, sîngerări și ruptura sinusoidelor, apariția unor grunji de bilă, infiltrații periportale sau în parenchim cu leucocite, limfocite, plasmocite, histiocite și fibroblaști. Celulele hepatice arată semne de distrofie cu întumescență. Numeroase celule nu posedă nucleu, iar citoplasma îngrămădindu-se la marginea membranei celulare, imprimă celulei un aspect vacuolizat. Uneori colorația celulelor hepatice este inegală, nucleii au dimensiuni variabile, uneori conțin vacuole sau nucleolul este mărit. Necroza în focare a celulelor poate fi observată frecvent. Incluzii nucleare, care după Nicolau sînt caracteristice pentru hepatita epidemică, am observat rar. Simptome de icter au apărut numai la un singur animal.

II. După inocularea hamsterilor cu ser normal de om (36 animale) nu am observat nici o modificare a ficatului.

III. La un lot de 36 de hamsteri care au fost inoculați pe cale i. h. cu materii fecale filtrate, respectiv cu supernatantul suspensiei celulelor hepatice — obținut după autopsierea decedaților cu hepatită — la 83,3% au apărut modificări histopatologice în ficat. Hepatită tipică însă a apărut numai într-un singur caz. În urma inoculării la 6 animale sănătoase — pe cale i. h. — a supernatantului celulelor hepatice rezultate de la acest animal, în toate cazurile apar leziuni grave în ficat. Aceste rezultate arată transmisibilitatea agentului patogen de la hamster la hamster prin inoculări i. h.

IV. Din 124 de hamsteri, 41 au fost inoculați cu lichidul culturilor de celule hepatice de embrion uman, infectate cu seruri și materii fecale provenite de la bolnavi, după o cultivare de 14 zile. Alterări hepatice s-au înregistrat la 28 de animale (68,3%). La un lot de 65 de animale după inocularea pe cale i. h. cu tulpinile de virusuri izolate de noi (R, V9, V6, RT 110, S III), pe care le-am considerat candidate de virusuri hepatitice, la 89,2% am constatat apariția alterărilor în celulele hepatice. Virusul Motol, izolat de Kubelka (8), nu a fost patogen pentru cei 5 hamsteri infectați.

La animalele martore inoculate cu lichidul culturilor de celule neinfectate (13 animale) nu au apărut leziuni hepatice.

Cele mai grave leziuni hepatice le-au provocat virusurile RT 110 și R. Aceste leziuni seamănă foarte mult cu cele descrise la om în hepatita epidemică tipică.

V. Receptivitatea hamsterilor față de infecția experimentală cu virusurile izolate de noi a fost obiectivul unor cercetări din 1964—1965, legate de studiul proprietăților imunogene ale acestor virusuri, în cadrul cercetărilor de imunizare activă.

În acest lot au fost folosiți 84 de hamsteri, din care 60 au fost infectați cu virusuri formolizate, 18 au primit virus viu, neinactivat, iar 6 ne-au servit ca martori.

Virusurile vii după 1 lună, respectiv 2 luni au putut fi reizolate din materiile fecale ale hamsterilor. Acțiunea citopatică a virusurilor a fost urmărită pe linia de celule D—6 (VA), în pasagii repetate. În citoplasma celulelor hepatice ale acestor hamsteri apar particule virotice cu dimensiuni între 15—70 milimicroni.

Virusurile tratate cu formol nu au putut fi reizolate, ele însă imprimă animalelor o imunitate solidă față de virusul viu, omolog (12).

VI. În perioada anilor 1966—1971 am izolat noi tulpini de virusuri din cazuri de hepatită (virusurile 208, 226, 250, 258, 270, 272), cu care s-au inoculat pe cale i. p., cu doze de 0,2, respectiv 1 cc 153 de hamsteri, cu scopul de a compara acțiunea noilor tulpini de virusuri cu a celor izolate în anii anteriori (R, V9, 163). Rezultatele sînt cuprinse în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Tulpina de virus	Modificările histopatologice ale ficatului (nr. animale)					
	Ușoare	Evidente	Țesut conj.	Icter	Fără leziuni	Total
208	7	22	7	1	—	37
226	5	15	1	—	1	22
250	1	5	1	—	1	8
258	1	12	3	3	—	19
270	1	3	5	1	1	11
272	1	5	2	—	—	8
Martori	3	—	—	—	14	17
R	2	5	2	—	—	9
V9	—	3	—	—	—	3
163	2	8	5	2	2	19
Total	23	78	26	7	19	153

Dintre tulpinile de virusuri — după cum am stabilit ulterior — 226 și 250 erau adenovirusuri; după purificare și ultracentrifugare însă, pe lângă particulele tipice de adenovirus cu dimensiuni de 90 milimicroni, am găsit și particule mai mici de 15—30 milimicroni.

Din cele 153 de animale care au fost inoculate în acest lot, la un număr de 19 (12,4%) nu s-au găsit semne de alterări la nivelul ficatului, însă din acest număr 14 reprezintă lotul martor (neinoculați), deci, dintre animalele inoculate cu tulpini de virusuri numai 5 (3,2%) nu au prezentat leziuni.

Cazurile cu leziuni histopatologice evidente (67,9%) constituie cea mai importantă parte a cercetărilor noastre. În ficatul acestor animale pe lângă leziunile descrise la punctul I, în 26 de cazuri am observat apariția țesutului conjunctiv, apreciere efectuată pe baza pătrunderii fibroblaștilor și a elementelor conjunctive în parenchimul hepatic.

Se pare că adaptarea virusurilor la cultivarea in vitro modifică acțiunea patogenă a acestora față de hamsteri, tulpinile care pe liniile de celule au arătat un efect citopatic mai pronunțat au declanșat și modificările cele mai intense la nivelul ficatului în urma inoculării lor la hamsteri.

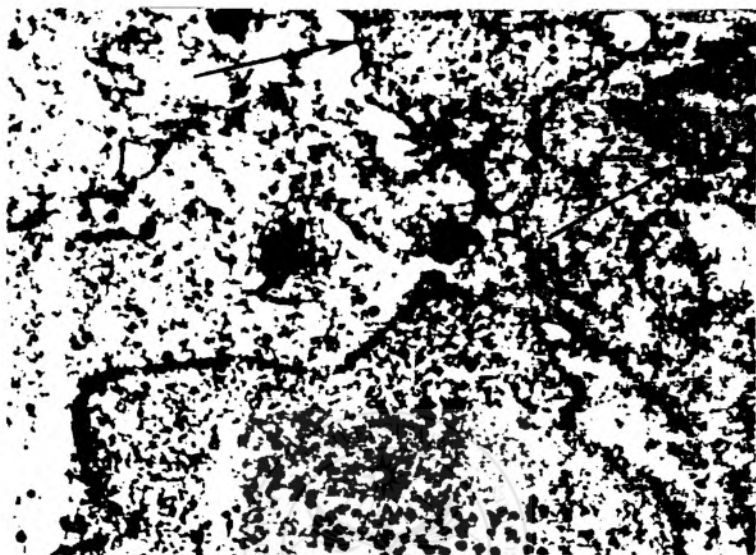


Fig. nr. 1: Citoplasma unei celule Detroit-6(VA) după infecție cu adenovirusul tip 3 și virusul hepatitic R. Apariția adenovirusurilor în citoplasmă și nucleu. Particule mici electronoptic dense având dimensiunea tulpinei R (vezi săgeata). Mărire: 35 000 X

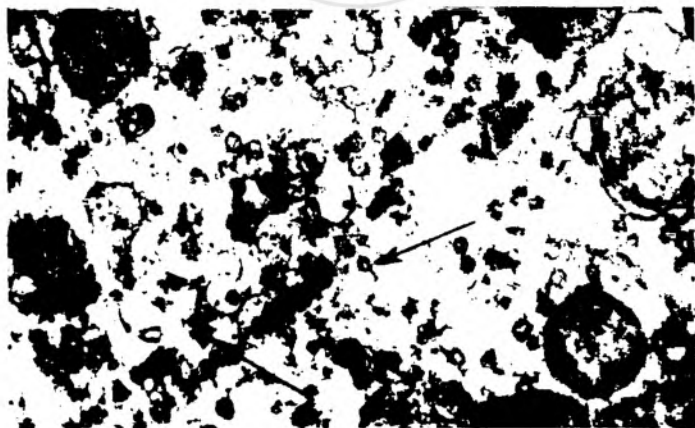


Fig. nr. 2: În citoplasma unei celule hepatice de hamster după infecția cu virusul R cultivat în prezența adenovirusului tip 3, apar formațiuni inelare, unele având o membrană dublă. Mărire: 35 000

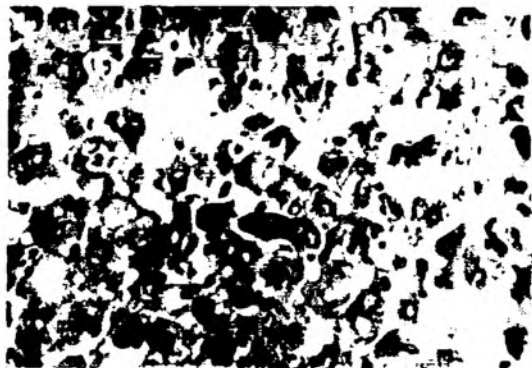


Fig. nr. 3: Ficat de hamster după infecție cu virusul hepatitic. Necroze celulare izolate. Anisocitoza și colorația inegală a celulelor, cu numeroase celule binucleate domină tabloul histopatologic. Ob. 20 \times , Oc. 10 \times

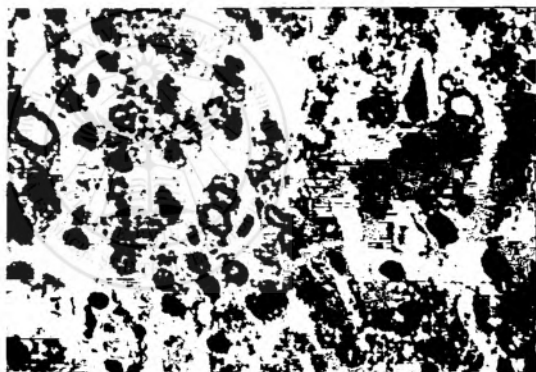


Fig. nr. 4: Ficat de hamster după infecție cu virusul R. Vacuolizarea nucleilor este prezentă. Ob. 20 \times , Oc. 10 \times



Fig. nr. 5: Necroza parțială a parenchimului hepatic la hamsterul infectat cu tulpina de virus hepatic R. Ob. 20 \times , Oc. 10 \times

VII. Apariția — mai precis prezența — unor particule virale pe lângă adenovirusuri în serul bolnavilor de hepatită (13) ne-a sugerat să încercăm pe animale de experiențe transmiterea unei tulpini de virus, obținută prin cultivarea simultană a unui virus izolat din hepatită cu adenovirusul tip 3. După ipoteza noastră virusurile hepatitice se multiplică lent sau se integrează în celula gazdă fiind defective, pentru replicarea intensivă au nevoie de prezența unui virus complementar (helper-virus), asemănător grupului adenovirusurilor. În cursul acestor cercetări, cinci tulpini de virusuri hepatitice (258, 270, 208, R și V9) au fost trecute în doză de 2 cc ($DCP_{50} = 0,2$ cc din diluția 10^{-6}) pe celule D—6 (VA), care cu trei ore mai înainte au fost infectate cu adenovirusul tip 3 (2 cc din diluția 10^{-6}). După 4—7 zile de la infectare, când majoritatea celulelor au prezentat un efect citopatic marcat, lichidul supernatant s-a recoltat în condiții sterile. Cu acesta s-au efectuat inoculări la 62 de hamsteri. Animalele au fost urmărite 6 săptămâni, fiind apoi sacrificate. Modificările histopatologice din ficat sînt prezentate în tabelul nr. 2.

Tabelul nr. 2

Tulpina de virus	Modificările histopatologice ale ficatului (nr. animale)					
	Ușoare	Evidente	Țesut conj.	Icter	Fără leziuni	Total
Adeno 3 258 +	10	4	—	—	7	21
Adeno 270 +	—	4	1	—	2	7
Adeno 3 208 +	3	2	3	—	—	8
Adeno R +	—	4	8	—	—	12
Adeno V9 +	—	2	2	—	—	4
Adeno	—	5	5	—	—	10
Total	13	21	19	—	9	62

Modificările parenchimului hepatic, corespund în parte cu cele descrise după aplicarea inoculărilor cu virusurile R, 163, 258, 208, 270 etc., însă adenovirusul tip 3 este slab patogen pentru hamsteri. Diferențe în intensitatea leziunilor pot fi observate la toate seriile de animale care au primit virusuri „hibridizate” (258+adeno, 208+adeno etc.). Infiltrațiile celulare sînt extinse și apar fascicule de țesut conjunctiv printre trabeculele hepatice. Sînt foarte irecvente hemoragiile și necrozele izolate. La nivelul nucleilor în câteva cazuri am găsit incluzii nucleare. La aceste animale se observă creșterea în volum a ficatului și îngroșarea capsulei hepatice, modificări care lipsesc în infecțiile cu virusurile „nehibridizate”.

Discutarea rezultatelor și concluzii

Rezultatele cercetărilor noastre efectuate pe hamsteri între anii 1957—1971, privind studiarea transmisibilității hepatitei virale, aduc argumente histopatologice, imunologice și electronmicroscopice pentru receptivitatea acestor rozătoare mici față de virusurile hepatitei umane.

Se pare că unele specii de maimuțe sudamericane sînt deosebit de sensibile față de aceste virusuri. Într-o lucrare mai recentă, *Deinhardt* și colab. (5) arată susceptibilitatea marmosetelor față de virusurile hepatitice. Din 53 de animale inoculate cu material de control (plasmă umană normală) la nici unul nu s-a produs hepatită, însă la un număr de 41 de animale — din 61 infectate cu material hepatitic — a apărut hepatita cu o activitate enzimatică crescută, precum și alterări histopatologice. La cele 100 de animale martor, boala spontană nu a apărut, ceea ce arată că apariția hepatitei la animalele infectate nu poate fi datorată activării unui virus latent al marmosetelor. Autorii presupun existența a mai multor serotipuri de virusuri hepatitice. Aceste virusuri, de exemplu tulpina GB, au dimensiuni reduse (20 milimicroni), sînt inactivate la 60° C, în 30 de minute și nu au relații antigenice cu antigenul Australia.

Folosirea marmosetelor pentru cercetări experimentale este însă deosebit de costisitoare, hamsterii fiind mai ușor accesibili pentru cercetările curente în domeniul hepatitei virale, după cum demonstrează și concluziile următoare:

1. Produsele patologice ale bolnavilor hepatitici, ca și lichidul culturilor de celule infectate cu aceste materiale, inoculate pe cale i. h. sau i. p. produc un tablou histopatologic în mare parte analog cu cel găsit în hepatita umană.

2. Tulpinile de virusuri izolate între anii 1961—1971 au proprietăți hepatitice pentru hamsteri (de ex. virusurile R, 208, 286 etc.).

3. În urma inoculărilor efectuate cu virusuri formolizate (R, V9, V6, 163) animalele devin imune față de infecția cu virus viu, omolog. Animalele inoculate cu virusuri vii, elimină agenții virali chiar și după două luni de la infecție. În ficatul acestor animale, la examenul cu microscopul electronic, pot fi decelate particule virale cu dimensiuni între 15—70 milimicroni.

4. Reproducerea cea mai fidelă a hepatitei la hamsteri a putut fi realizată prin infectarea animalelor cu tulpini obținute prin cultivarea simultană a virusurilor hepatitice cu adenovirusuri, fapt care denotă caracterul „helper” al adenovirusurilor și natura defectivă a virusurilor hepatitei umane. Un fenomen similar s-a observat și în cazul replicării tulpinei K—30, izolată de *Boggs*, aceasta fiind condiționată de prezența unui adenovirus „helper” (5).

Sosit la redacție: 10 iunie 1972.

Bibliografie

1. ANDERSEN T. T., TULINIUS S.: Acta med. Scand. (1938), 95, 497; 2. ARAKAWA S., MURAOKA T., KANEKO T., SEKI T., GOTO N.: Jap. J. Microbiol. (1960), 4 4, 371; 3. BERTÓK L.: Zschr. f. Immunitätsforsch. und Allergieforsch. (1963), 125, 358; 4. DEINHARDT F., HOLMES A. W., CAPPS R. B., POPPER H.: J. Exptl. Med. (1967), 125, 4, 673; 5. DEINHARDT F., WOLFE L., JUNGE U., HOLMES A. W.: Canad. Med. Ass. J. (1972), 106. Special Issue 468; 6. DICK W. G., NIVEN G. S., GLEDHILL A. W.: British J. Exp. Path. (1956), 37, 90; 7. HILLIS W. D.: Am. J. Hyg. (1961), 73, 316; 8. KUBELKA V., SLAVIK K., SOUSEK O., BARTH P.: Acta Univ. Carolinae. Ser. Med. Praha (1959), Suppl. 7; 9. LÁSZLÓ I., ÁBRAHÁM AL., PÉTER M., KISS E., DOMOKOS L., MAKAI MARGIT, SZENTKIRÁLYI ÉVA, KOVÁTS F., BÁLINT E.: Rev. Med. (1961), 2, 171; 10. LÁSZLÓ J., PÉTER M., FILEP GY., KASZA L., ALMÁSI ZSUZSA, BOTH IULIANA, NAGY B.: Rev. Med. (1962), 8, 297; 11. LÁSZLÓ I., PÉTER M., FILEP V., BÁLINT E., ÁBRAHÁM AL., IZSÁK A., ALMÁSI SUSANA, SABÁU MONICA, KASZA L.: Rev. Med. (1964), 10, 280; 12. LÁSZLÓ J., PÉTER M., FILEP GY., BÁLINT E., ALMÁSI ZSUZSÁNNA, ÁBRAHÁM S., SABÁU MONICA: Z. Ges. inn. Med. (1966), 21 6, 174; 13. LÁSZLÓ I., MUNTEANU SANDA, BOTH IULIANA, SEBE A., FILEP V., ALMÁSI SUSANA: Rev. Med. (1967), 13, 266; 14. LÁSZLÓ I., FILEP V.,

ALMÁSI SUSANA: Rev. roum. d'inframicrobiol. (1968), 5, 1, 49; 15. LÁSZLÓ J.: Rev. roum. d'inframicrobiol. (1969), 6, 4, 263; 16. LÁSZLÓ I., FILEP V., MUNTEANU P. SANDA, IULIANA BOTH: Rev. Med. (1972), 18, 32; 17. NICOLAU ŞT. S.: Hepatitele infecţioase inframicrobiene. Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1957; 18. PRIMAVESI K. A., STÖCKER E. M.: Zschr. f. Hyg. (1958), 145, 181; 19. TERSKIH: cit. Nicolau; 20. WILDFÜHR G.: Zschr. Ges. inn. Med. (1953), 8, 573.
