

## HEPATITISES BETEGEKBŐL IZOLÁLT VÍRUSOK VIZSGÁLATA

László J., Both Júliánna, Filep Gy., Palencsár A., Piros Sanda

Az A és B típusú hepatitisből kimutatott vírusok tulajdonságainak tanulmányozása során elért eredmények (1) s az ezeket követő kiegészítő kutatások (2, 3), új távlatokat nyitottak a víruseredetű májgyulladás elkülönítő kórisméjének terén.

Az eddigi kutatások a különböző hepatitis vírusokkal kapcsolatban az alábbiakat emelik ki:

Az *A típusú hepatitis vírus* gömbalakú, 27—28 nm átmérőjű, 32 capsomerrel rendelkező, RNS tartalmú részecske, mely a betegség heveny szakában a székletben fordul elő nagy mennyiségben. A vírus a májsejtek citoplasmájában helyezkedik el; érzékeny az UV sugarakkal szemben, 100° C-on 5 perc alatt elpusztul s az 1/4000 hígítású formalin inaktiválja. A fajlagos immunsavó hatására a vírusrészecskék összecsapódása következik be. Megfigyelték azt is, hogy az A típusú hepatitisből származó kóros anyaggal oltottak székletében a már említett nagyságrendű részeken kívül, 22— és 30 nm átmérőjű vírusok is megjelentek, melyek közül egyesek központi maggal (nucleocapsid) nem rendelkeznek.

Provost és Hilleman (4) adatai szerint az A vírus az FRHK 6 jelzésű embrionális vesesejtvonalon tenyészthető, citopathogen hatás kiváltása nélkül.

Egyes serologiai vizsgálatok (immunofluoreszcencia, immunoelektronmikroszkópos vizsgálatok, immunoaderencia, stb.) megerősítették a már említett vírus kóroktani szerepét az A típusú hepatitis kiváltásában.

A *B típusú hepatitis vírusa Dane* adatai szerint (5) 42 nm átmérőjű részecske. A beteg egyén vérsavójában a vírus mellett 20 nm átmérőjű gömbalakú és tubuláris képletek nagy számban találhatók. A Dane-féle vírus 28 nm átmérőjű központi magot és 7 nm vastagságú burkot tartalmaz. Mivel a fajlagos ellenanyag az összes felsorolt formákat összecsapja, azt jelenti, hogy mindegyikben jelen van egy közös felületi antigén, az ún. HBsAg. Heveny kórfarmák esetén a központi maggal (HBcAg jelzésű „core” antigén) szembeni ellenanyagok korábban jelennek meg mint a HBsAg-vel szemben képződők, s megtalálhatók a B vírust hordozók vérsavójában is. A Dane vírusban a HBs és HBc antigén mellett DNS polimeráz is megtalálható. Az antigének a sejtmagban, a burok ezzel szemben a citoplasmában képződik.

A HBsAg hordozók májsejtjeiben 35 nm nagyságrendű vírusokat is megfigyeltek, melyek valószínűleg a B vírus átmeneti formái. Nagyságrend szempontjából ezek eltérnek az A típusú hepatitisben szenvedők májsejtjeiben megfigyelt 80—160 nm, illetve a székletszűrletben előforduló 36—40 nm nagyságrendű résztől.

A non-A, non-B (NANB) hepatitis vírusára vonatkozó adatok egyre számosabbak. A víruseredetű májgyulladásnak ezt a formáját vérátömlesztés után írták le (Feinstone, 6). A jelenlegi vélemények alapján a post-transzfúziós hepatitisek 90 %-ában mint kiváltó ágens, az említett vírus szerepel. Bradley és munkatársai szerint (7) a vírus 27 nm nagyságú s a virushordozó véradók szérumával csimpánzra átvihető. Bradley és mtsai egyébként megerősítik Tabor és mtsai (8), illetve Alter és mtsai (9) eredményeit a NANB vírus majmokra való átvitelével kapcsolatban.

Úgy tűnik, hogy a NANB vírus által kiváltott májkárosodások, melyek a májlebenyek kóros elváltozásaiban, acidofil és göcos elhalásban, a sinusoidok és periportális tér limfociták beszűrődésében, a Kupfer-sejtek hiperpláziájában, magelváltozásokban és többmagvú májsejtek megjelenésében nyilvánulnak meg, bár nem jellemzői az NANB vírus általi hepatitisnek — mivel az A és B vírus fertőzésekben is előfordulnak —, a kórokozó hepatotropizmusát kiemelik.

Jóllehet a több mint két évtizedes kutatásaink során számtalan esetben bemutattuk a hepatitiszes betegekben általunk izolált vírusok alaktani, biológiai és immunológiai tulajdonságait s többek között közöltük egy kísérleti vaccina előállításával és hatásosságával kapcsolatos eredményeinket; 1978—1979-es évek során újabb kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy összehasonlíthassuk a régebben izolált vírustörzsekkel azokkal, melyeket újabban mutattunk ki a betegek kóros váladékaiból, illetve azokkal, melyeket Feinstone és mtsai (10) és Dienstag és mtsai (11) írtak le s melyek megfelelnek a hepatitis A vírusának.

Dolgozatunkban főleg az utóbbi években izolált vírusokkal foglalkozunk.

### Vizsgálati anyag és módszer

a) Heveny hepatitiszes betegekben származó vérsavókat — melyekben nem találtunk HBsAg-t —, illetve széketet, előzetes inaktiválás nélkül vittük rá sejtkultúrákra. A vérsavókból 0,2 ml-t, széketből 1 ml-t oltottunk a sejtekre.

b) Táptalajok és sejtkultúrák: a vírusok izolálására a mostani kísérleteink alkalmával a KB sejtvonalat használtuk, melyet eredetileg a bukaresti S. S. Nicolau Vírustani Intézet bocsátott rendelkezésünkre. A sejtek tenyésztésére az M—199 jelzésű táptalajt találtuk a legjobbnak, 10 %-nyi borjúsavóval. (E táptalajt a bukaresti Dr. I. Cantacuzino Intézet készíti.) A kóros anyagból történő vírusizoláláskor a savó mennyiségét 1—2 %-ra csökkentjük. A vírusok esetleges sejtkárosító hatásának megállapítása végett a fertőzött sejtkultúrákat naponként, 15 napig vizsgáljuk. Amennyiben a sejteken citopathogén hatás mutatkozik, a felülúszót tároljuk további átvitel céljából és szerológiai vizsgálatokra, a sejteket pedig elektronmikroszkópos vizsgálatokra használjuk fel.

c) Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat az általunk már használt és bevált módszerek alapján végeztük (12). A sejtkultúrákat előzetes 1,5 %-os glutaraldehyd fixálás után Millonig szerint rögzítettük, majd Vestopal W-ba vagy butil- és metilmetakrilát keverékbe ágyaztuk. Az ultravékony metszeteket TESLA BS 613 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

d) A vírusok hővel és kémiai anyagokkal szembeni érzékenységének vizsgálata: a vírusszuszpenziókat 60° C-on 30 percig kezeltük, majd sejkultúrára vittük és követtük a citopathogén (CP) hatás megjelenését. Kémiai anyagok közül a Genetron, éter és az 5-bromo-2 desoxyuridin (BUDR) vírusokra gyakorolt hatását követtük. A BUDR-ből 100 mikrogrammot adtunk 1 ml táptalajhoz. E kísérlet sorozatban is követtük a CP hatás megjelenését s egyúttal elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk.

e) Szerológiai vizsgálatok: az egyes izolált vírustörzsekkel szembeni immunválaszt (F 41H, M—133, F 265 vírusok) a *Friedmann és Bennett* által alkalmazott passzív hemagglutinációval és vírussemlegesítő próbakkal tanulmányoztuk. A vírusantigének koncentrációja Genetron-kezeléssel és dialízissel történt.

## Eredmények

### 1. A vírusok izolálása

A 86 kóros anyag (szérum és széklet) közül, 46 savóból 29, 19 székletből mind a 19 CP hatást váltott ki a KB sejteken. Jóllehet a CP hatás, mely a fertőzéstől számított 7—15. napon jelentkezik és a sejtek góckban megnyilvánuló lekerekedésében, majd később azok lelökődésében éri el a tetőfokát, nem jellegzetes, nem hasonlít az enterovírusok által kiváltott CP hatáshoz, olykor pedig alig észrevehető, mégis felhívja a figyelmet az esetleg jelenlévő vírusokra. Csupán a sorozatos átvitel ép sejtekre és az elektronmikroszkópos eredmények erősítik meg a sejteltváltozások fajlagos — esetünkben víruseredetű — jellegét.

Vizsgálataink során 12 hepatitisés betegtől származó szérumban és székletszűrletben követtük a vírusok megjelenését. Csupán a *vérsavóban jelen volt a vírus 6 alkalommal* (Hs 301, Hs 308, Hs 328, Hs 345, Hs 349, Hs 351 jelzésű vírusok), a *székletszűrletben 2* anyagban, míg a *vérsavóból és székletszűrletből egyidejűleg 4* esetben találtuk meg a kórokozókat (Hs 280 és F 281; Hs 298 és F 299; Hs 332 és F 324; Hs 347 és F 348 vírusok). Annak ellenére, hogy a fenti eredmények 12 esetre vonatkoznak, megállapítható, hogy a hepatitis kezdeti szakában a virémia igen kifejezett.

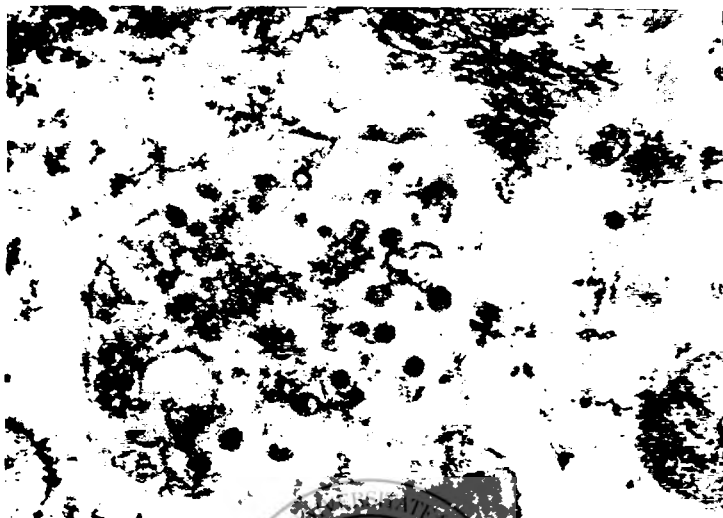
### 2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

25 általunk izolált vírustörzsből, melyek közül 13 vérsavóból, 12 pedig székletből származott, elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, egyrészt a vírusok alaktani sajátosságainak megállapítása végett, másrészt pedig a szaporodás tanulmányozása céljából.

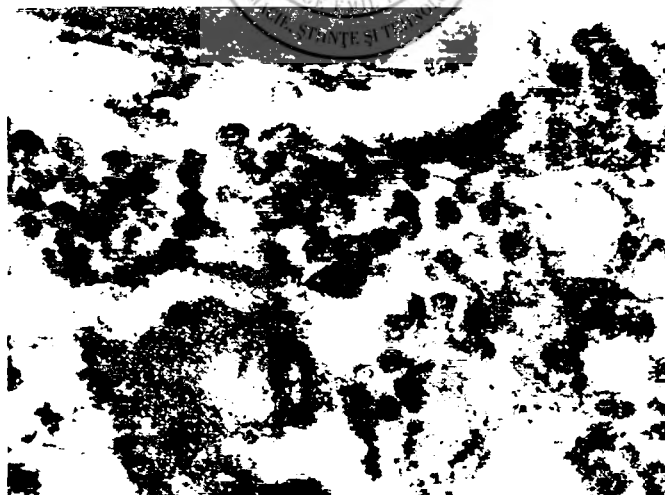
Amint már az előzőekben is említettük, a hepatitis vírusok replikációja az általunk felhasznált KB sejt vonal sejtjeiben lassú. Elektronmikroszkóppal követve a vírusok szaporodását, az 5. napon kisszámú vírusrészecske elszórtan jelenik meg a sejtek citoplasmájában. A fertőzés utáni 7—15. napon a vírusok egy része a citoplasmában képződő vacuolákban látható (Hs 300, Hs 32, F 265, F 315 jelzésű vírusok), vagy pedig kisebb-nagyobb halmazokban helyezkednek el a plasmában (F 365, F 406, Hs 351, F 281, Hs 280, F 94, Hs 307, Hs 308 vírusok). Két esetben a vírusok nemcsak a citoplasmában, hanem a magban is megjelentek (F 365 és F 97 jelzésű vírusok).



1. ábra: KB sejtek citoplasmájában elhelyezkedő 27—40 nm nagyságú vírusok. Nagyítás 85.000 X



2. ábra: Vacuolában elhelyezkedő hepatitis A vírusok, melyeknek egy része csupán burokkal rendelkezik. Nagyítás 85.000 X



3. ábra: A KB sejt citoplasmájában csoportosan látható vírusok zöménél a nucleocapsid hiányzik. Nagyítás 85.000 X

Nagyságrend alapján az általunk izolált hepatitis vírusok, a következő csoportokba oszthatók:

a) 27 nm nagyságú vírusok; egyes törzseknél a nucleocapsid és a burok is megtalálható (F 315, Hs 32 vírusok), másoknál a nucleocapsid igen kicsiny vagy hiányzik (F 406 és I 445 vírusok);

b) 40—42 nm átmérjű vírusok; ezek közül egyeseknél jelen van a központi mag (Hs 300 és F 265), de a vírusrészek között számos incomplet alak is látható. Megjegyezni kívánjuk, hogy az R jelzésű vírustörzs, melyet még 1962-ben izoláltunk, hasonló alakokkal rendelkezik.

c) 45—50 nm nagyságú vírusok közé sorolható az F 365 törzs, és egy non-A, non-B hepatitisből származó NANB 31 jelzésű vírus. A vírusrészekék jelentős része nucleocapsiddal is rendelkezik.

### 3. A hepatitises betegekből izolált vírustörzsek fizikai és kémiai tényezőkkel szembeni viselkedése

Az F 265, F 315, F 365 és Hs 351 törzseket 30 percig 60° C-on tartottuk, majd KB sejtekre vittük át s 15 napig naponta ellenőriztük a citopathogén hatás megjelenését. Megjegyezni kívánjuk, hogy az összes vírus CP hatást váltott ki a sejt kultúrákon, jeléül annak, hogy a fenti hőmérséklet nem csökkentette sejtkárosító tulajdonságaikat.

Az előbbi vírustörzseket háromszori fagyasztásnak és felolvasztásnak is alávetettük, anélkül, hogy ezek az eljárások a vírusok CP hatását módosították volna.

Sem a Genetronos kezelés, sem pedig a virusszuszpenziók étterrel való kirázása nem változtatta meg vírustörzseink pathogén tulajdonságait. A táptalajhoz adott BUDR (100 mikrogram/ml táptalaj) nem módosította a vírusok replikációját a KB sejteken.

### 4. Szerológiai vizsgálatok

A Friedmann és Bennett által használt passzív hemagglutinációt 77 hepatitises vérsavóból az F 41, M—133 és F 265 antigénnel végeztük. Az F 41 Ag-vel szemben ellenanyagokat találtunk az esetek 32 %-ában, az M—133 Ag esetén 20 %-ban, míg az F 265 Ag-nel szemben ellenanyagok 27 %-ban jelentek meg. Az alacsony értékek azzal magyarázhatók, hogy az ellenanyagok kimutatására felhasznált vérsavók a betegség első hetéből, legkésőbb a betegség második hetéből származtak. E kísérletsorozatban nem követtük az ellenanyagok titerének változását a betegség egész tartama kapcsán.

### Az eredmények megbeszélése

Az 1978—1979-es évek során tanulmányozott 86 kóros anyagból 48 a fertőzés után 7—15 nap múlva a KB sejteken citopathogén hatást fejtett ki, melynek jellege megfelel azoknak, amelyeket régebbi kísérleteink során is észleltünk (1957—1977) (13).

Mind a régi, mind pedig az új vírustörzsek hasonló módon viselkednek a sejt vonalakon. Az a CP hatás, amelyet az 1957—67 évek között végzett kísérleteink alkalmával a hipertetraploid Detroit-6 (VA) sejteken észleltünk, megfelel annak, mely a KB sejt vonalon jelentkezik. A hepatitis

vírusok replikációjára jellemző a sejtkárosodások göcös jellege, mely folyamat lassan terjed, továbbá a CP hatás átmeneti eltűnése, ami azt jelenti, hogy egyes átoltások után a CP hatás oly kislefokú marad, hogy alig határozható meg. Véleményünk szerint ez a jelenség az A típusú hepatitis vírus szaporodására jellemző. A lassú szaporodás oka a vírusok defektív tulajdonságával megmagyarázható. Sok esetben a vírusrészecskék zöme csupán burokkal rendelkező, elektronmikroszkóppal „üresnek“ tűnő, tehát nucleocapsidot nem tartalmazó képleteknek mutatkoznak.

Már régen megfigyeltük és több alkalommal is ismertettük az adenovírusok szerepét a hepatitis vírusok replikációjában, igazolván az adenovírusok helper vírusként való viselkedését a defektív jellegű hepatitis vírusok replikációjában. In vivo pedig az adenovírusok fokozzák a hepatitis A vírus kórokozóképességét (14).

Szeretnénk kiemelni azt a tényt, hogy már kutatásaink első éveiben felhívtuk a figyelmet és bizonyítottuk a hepatitis vírusok tenyésztését a Detroit-6 (VA) és KB sejtvonalakon (15, 16), mely jelenséget 1979-ben Provost és Hilleman (4) — komplex vizsgálati eljárásokkal — az FRHK 6 sejtvonalon is igazolt, jóllehet e majomveséből nyert sejteken CP hatást nem tudott kimutatni. Egyébként kevés sejtvonal, illetve primer sejtkultúra alkalmas a hepatitis vírusok tenyésztésére. A hepatitis B vírusát (vizsgálati anyag az AU-SH antigén, Zuckerman professzor kollekciónak származott) 1970-ben csupán a Detroit-6 (VA) sejteken tudtuk tenyészteni. Elektronmikroszkópos vizsgálataink igazolták, hogy a Dane-féle részecskék — melyekkel kapcsolatban ma már elfogadták, hogy azok a B vírusnak felelnek meg — a fertőzött sejtek citoplasmájában csupán a 18. napon jelennek meg (17).

Eddigi kísérleteink megerősítik a módosított M—199 táptalaj különleges szerepét a hepatitis vírusok in vitro történő tenyésztésében.

Vizsgálataink során a KB sejteken három, különböző nagyságrendbe sorolható vírust sikerült kimutatni, 27 nm, 40—42 nm és 45—50 nm átmérőjű részeket. Hasonló nagyságrendű vírusok hepatitiszes székletben való előfordulását, mint azt Gust idézi (18), más szerzők is megfigyelhették.

A hepatitisből izolált vírusok méretbeli ingadozásait, még 1962-ben leírtuk, mind kóros anyagban, mind pedig az ezekkel fertőzött sejtkultúrákban (15). A vírusrészecskék nagysága 15—70 nm között ingadozott, nagy gyakorisággal találtunk azonban 20—30 nm átmérőjű, incomplet „központi mag nélküli“ alakokat. Feltételezhető, hogy a nagyságbeli eltérések az in vitro történő tenyésztési viszonyoktól és a táptalaj összetételétől függenek. Számos törzs esetében a plasmában szaporodó, csupán burokkal rendelkező vírusok száma jelentős.

Az általunk izolált vírusok RNS-t tartalmaznak, viszonylagos ellenállóképességgel rendelkeznek, étterrel, Genetronnal való kezeléssel szemben rezisztensek. A formalin 1/4000 koncentrációban inaktíválja. A hepatitis vírusok ezen tulajdonságait régebbi munkáinkban ismertettük.

Annak ellenére, hogy e dolgozatban nem számoltunk be az A vírus hamsterre való átvitelével kapcsolatos kísérleteinkről, megemlíthetjük, hogy e vírusok hepatotrop tulajdonsága igen kifejezett s az állatok egy részének májában cirrhosisig menő elváltozásokat képesek kiváltani.

E kísérletsorozatban végzett szerológiai vizsgálataink az izolált törzsek közötti összefüggést tudták igazolni.

## Következtetések

1. Hepatitiszes anyagokból KB sejtvonalon számos vírustörzset sikerült izolálni, s ezáltal az A típusú hepatitis vírus tenyészthetőségét ismételtelen alátámasztottuk.

2. A csupán burokkal vagy burokkal és nucleocapsiddal rendelkező vírusok átlagos mérete 27 nm, de ettől a nagyságtól eltérő vírusrészek is megtalálhatók a fertőzött KB sejtek citoplasmájában s két esetben a magban is.

3. A hepatitis A vírusának in vitro történt tenyésztése során nyert eredmények e vírusok részleges defektív természetét látszanak igazolni.

*A szerkesztőségbe érkezett: 1979. szeptember 26-án.*

## Irodalom

1. Dmochowski L.: Am. J. Clin. Path. (1976), 65/5, 741; 2. Frösner G. G., Roggendorf M., Scheid R., Deinhardt F.: Internat. Sympos. on Viral Hepatitis. 1979. April 5—7, 306; 3. Robinson W. S., Sattler F., Siddiqui A.: Internat. Sympos. on Viral Hepatitis. 1979, April 5—7, 309; 4. Provost P. J., Hilleman M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1979), 160, 2, 213; 5. Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M.: Lancet (1970), 1, 695; 6. Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purcell R. H., Alter H. J., Holland P. V.: N. Engl. J. Med. (1975), 292, 767; 7. Bradley D. W. és mtsai: Memo H—1433/1 June. 1978; 8. Tabor E. és mtsai: Memo H—1337/1. Dec. 1977; 9. Alter H. J. és mtsai: Memo H—1341/1 Dec. 1977; 10. Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purcell R. A.: Science (1973), 182, 1026; 11. Dienstag J. L., Feinstone S. A., Kapikian A. Z. és mtsai: Lancet (1975), 1, 765; 12. László J., Bálint E., Filep Gy., Péter M., Ábrahám S., Almási Zsuzsa: Nature (1965), 207, 326; 13. László I.: Rev. roum. d'inframicrobiol. (1969), 6, 4, 263; 14. László I., Piros M. Sanda, Both Iuliana, Sebe B., Filep V., Almási Susana: Rev. Med. (Tg.-Mureş) (1967), 13, 3—4, 266; 15. László I., Péter M., Filep V., Ábrahám Al. és mtsai: Rev. Med. (Tg.-Mureş) (1962), 8, 1, 47; 16. László I., Both Iuliana, Filep V.: Rev. Med. (Tg.-Mureş), (1977), 23, 2, 99; 17. László I., Kasza L., Munteanu Sanda, Filep V.: Rev. Med. (Tg.-Mureş), (1970), 16, 2, 165; 18. Gust I. D.: Pathology (1978), 10, 299.

*J. László, Juliánna Both, Gy. Filep, A. Palencsár, Sanda Piros*

## EXAMINATION OF VIRUSES ISOLATED FROM HEPATITIS CASES

On the KB cell-line, from pathological material of hepatitis cases we have isolated such virus strains whose late cytopathogenic effect corresponds to the picture observed in the first stage of our experiments of this kind (1957—1967), thus proving the possibility of cultivating hepatitis viruses in vitro. As for the order of magnitude, the viruses correspond to that of hepatitis virus A, and the occurrence of particles differing from that can be accounted for the conditions of in vitro cultivation. The viruses containing RNA, being resistant to ether and relatively resistant to heat, but having the capacity to be inactivated with formalin of 1:4000 concentration prove their partly defective nature according to our present and previous investigations.