

## OBSERVAȚII ÎN LEGĂTURA CU CULTIVAREA VIRUSULUI HEPATITEI A PE LINIA CELULARĂ KB

I. László, Iuliana Both, V. Filep, Sanda Piros

Posibilitatea izolării unui agent filtrabil din produsele patologice ale bolnavilor de hepatită, folosind pentru cultivare celule hepatice de embrion uman (1) a putut fi confirmată de noi în 1962 (2) fiind completată ulterior într-o perioadă de peste 18 ani cu alte observații identice (3. 4. 5. 18, 19).

Utilizarea liniilor celulare Detroit-6 (VA) — linie hipertetraploidă — (6), respectiv KB, ne-a permis să subliniem atât cultivabilitatea virusului A cât și a celui B (7, 8), menționind aspectul deosebit, puțin caracteristic și inconstant al modificărilor celulare în cursul replicării lor.

Se pare că aceste virusuri și în special virusul hepatitei A, ar avea caractere defective: replicare lentă, prezența frecventă a unor particule incomplete în citoplasma celulelor (fără nucleocapsidă) și facilitarea replicării în prezența unui adenovirus (9).

În legătură cu replicarea virusurilor am stabilit că aceasta are loc în citoplasmă după 7—14 zile de la infectarea celulelor, urmată de așezarea particulelor virale în șiruri simetrice sau în grămezi, ori în interiorul unor vacuole (10).

Dimensiunea virusurilor izolate și menținute prin treceri succesive deseori oscilează. Majoritatea lor sînt de 15—70 nm, dar se găsesc particule între 20—60 nm, respectiv 30 nm (11).

Din punct de vedere morfologic cele de 70 nm sînt compuse din subunități, deseori neavînd miez central și au formă hexagonală, indiferent că sînt dispuse în grămezi sau în șiruri simetrice. Cele mici au formă sferică.

După observațiile lui *Provost* și *Hilleman* (12) virusul hepatitei A se propagă în celulele de explant de ficat de marmosete, respectiv în celulele liniei FRhK6 de rinichi de embrion de maimuță. *Frösner*, *Deinhardt* și colab. (13) menționează cultivabilitatea virusului A pe linia de celule de hepatom uman. Autorii confirmă absența ECP chiar după 4 săptămîni de la infectare găsind însă antigenul hepatitei A (AgHA) în cantități apreciable în extractul culturilor de celule.

Caracterizarea virusului A a fost prezentată de mai mulți autori, ca *Feinstone* și colab. (14), respectiv *Provost* și colab. (15), *Siegl* (16) și alții. Particulele virale cu simetrie cubică, sau avînd formă sferică au dimensiuni de 27—28 nm, cu densitate de 1,34 g/ml, 32 de capsomere și conțin ARN. Virusul rezistă la 60 C timp de 30 de minute, poate fi inactivat prin formol la 37 C după 72 de ore, la 100 C 1 minut și la o concentrație de clor 1 mg/l în 30 de minute (17).

Aceste caracteristici menționate în lucrările autorilor citați, în mare parte le-am precizat și noi în lucrările publicate între anii 1962—1965 (1, 2, 3, 5), respectiv în 1979 (18).

Scopul lucrării de față a fost urmărirea replicării unor noi tulpini de virusuri ale hepatitei A în celulele KB și studierea aspectelor morfologice ale acestora, comparând rezultatele obținute cu cele descrise anterior (18).

### Material și metodă

1. Materiile fecale ale bolnavilor de hepatită A, recoltate la debutul bolii, după omogenizare în soluție tampon Dulbecco și filtrare prin filtru G-5 Jena au fost supuse acțiunii căldurii la 60° C timp de 10 minute, apoi trecute în cantitate de 1 ml pe celule KB.

2. Mediul de menținere M-199 (modificat de Inst. Dr. I. Cantacuzino) cu 0,5—1 % ser de vițel inactivat și cu 50 micrograme kanamicină/ml s-a dovedit a fi corespunzător atât pentru izolarea virusurilor, cât și pentru efectuarea trecerilor succesive a tulpinilor de virusuri.

3. Culturile de celule au fost controlate zilnic, timp de 15 zile, după care a urmat fixarea celulelor cu 1,5 % glutaraldehidă în tampon Sörensen, continuată de fixarea cu fixatorul Millonig. După deshidratare cu alcool, celulele au fost incluse în amestec de metacrilat de butil și metil (8:2). Secțiunile ultrafine au fost examinate cu microscopul electronic TESLA BS 613.

4. Rezistența virusurilor față de căldură, Genetron, eter, formol, precum și replicarea în prezența de 5-bromo-2 dezoxiuridină (BUDR) s-a studiat după metodele folosite de noi în cercetările noastre anterioare (18).

5. Pentru stabilirea relațiilor antigenice dintre tulpinile izolate în 1979/80 și cele prezentate anterior, am folosit metoda imunoprecipitării în gel de agaroză utilizând ca seruri specifice serurile preparate pe hamsteri, față de virusurile hepatitei A (ser 282, 265 și M—133). Concentrarea antigenelor virale a fost efectuată cu Genetron și dializă față de polivinilpirolidon 20 %.

### Rezultate

1. Din materiile fecale ale bolnavilor s-au izolat numeroase tulpini de virusuri, din care 12 au fost studiate conform metodelor prezentate la punctele 1—5 ș. a. virusurile Hs 31, F 153, F 185, F 277, F 279, F 282 (în anul 1979) și F 32, F 33, F 47, F 109, F 122, F 123 (în anul 1980).

Celulele liniei KB abia după 7 zile de la infectare prezintă ușoare modificări necaracteristice pentru infecția virală, ca apariția unor celule rotunjite în focare, fenomen care spre a 14-a—15-a zi a infecției se accentuează. Deseori aceste celule se desprind de pe peretele recipientelor și astfel dispare continuitatea stratului celular.

În trecerile succesive ale virusurilor pe culturi KB aspectul moderat al efectului citopatogen (ECP) poate să se manifeste și în continuare, dar uneori dispare, ceea ce ne sugerează că în celulele infectate virusul este absent. În aceste cazuri, numai microscopia electronică respectiv imunofluorescența pledează pentru existența fenomenului de replicare.

Observațiile pe care le-am constatat în experiențele noastre recente sînt identice cu cele prezentate încă în anii 1957—1962 (1), ceea ce ne-a permis ca în această perioadă de peste 20 de ani să utilizăm metoda cultivării virusurilor hepatice pentru diagnosticul etiologic al hepatitelor virale.

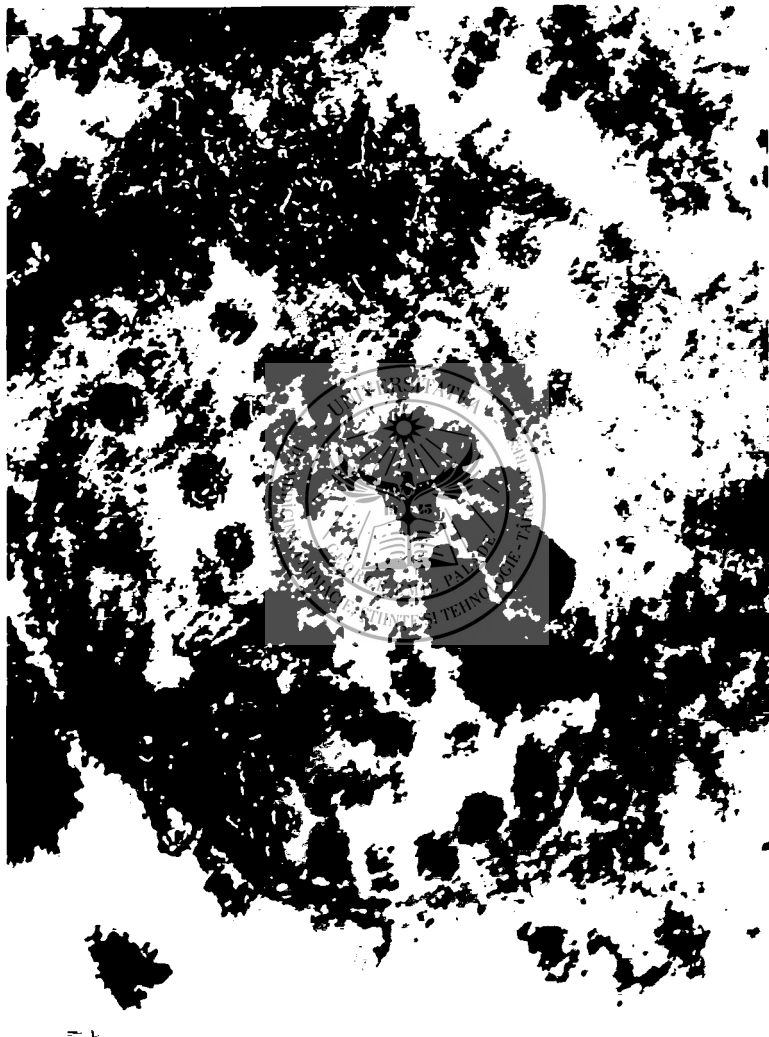


Fig. nr. 1: Virusul hepatitei A în interiorul unei vacuole citoplasmice (tulpina F 163). Dimensiunea particulelor virale este de cca 28—29 nm. Mărire: 240.000 X



Fig. nr. 2: Numeroase particule virale de 28 nm şi 40 nm în citoplasma unei celule KB. Mărire: 180.000 X

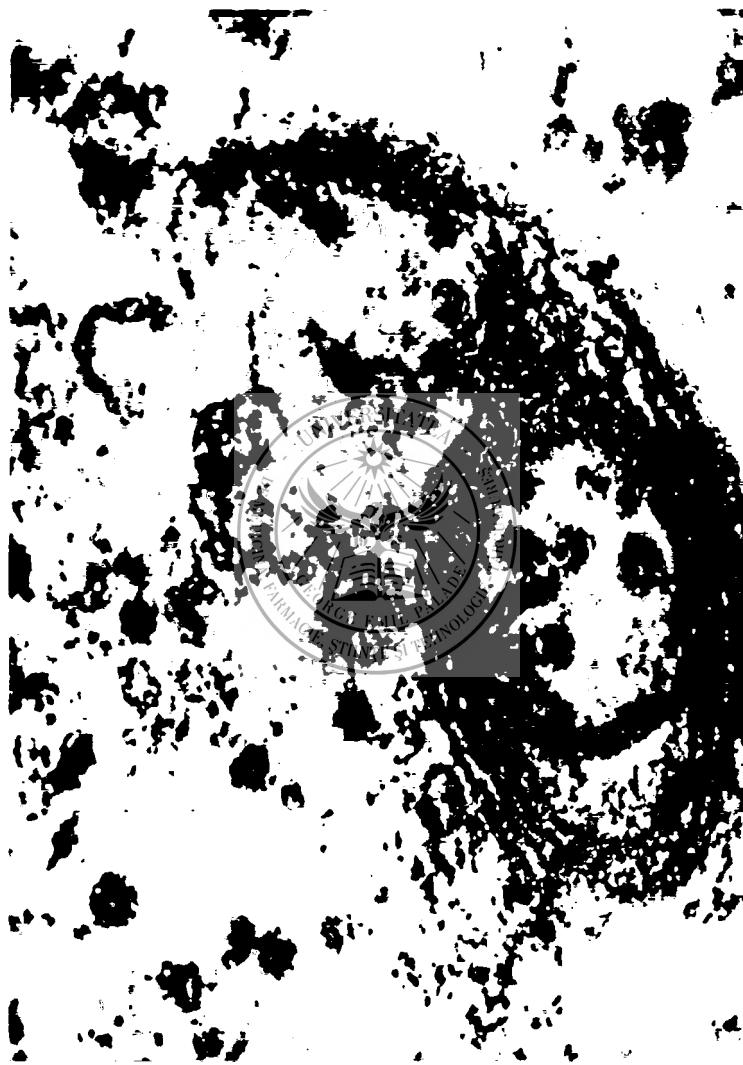


Fig. nr. 3: Virusul hepatitei A — tulpina Hs 32 — în citoplasma celulei KB. Dimensiunea particulelor oscilează între 28—40 şi 50 nm. Mărire: 180.000 X

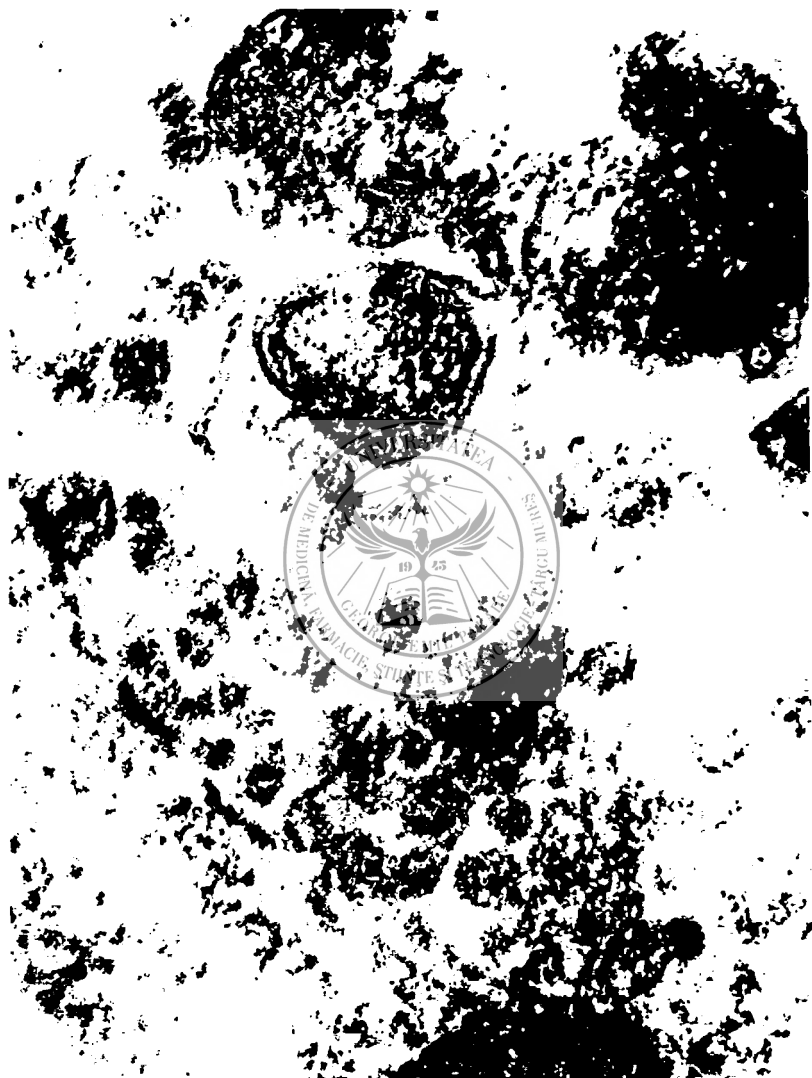


Fig. nr. 4: După infectarea celulelor KB cu AgHBs (antigenul HBs 1-am primit din colecția prof. A. J. Zuckerman, Londra) în citoplasmă apar particule de 28 nm și 57 nm, asemănătoare virusurilor. Mărire 180.000 X

2. Studiarea replicării virusului hepatitei A cu ajutorul microscopului electronic a arătat că replicarea lor începe după 5—7 zile de la infecția în citoplasmă, sub forma unor grămezi sau în interiorul unor vacuole. Aproape în 90% a cazurilor particulele virale se află în interiorul unor vacuole. După observațiile noastre, din totalitatea celulelor în 10% găsim particule virale.

Între a 7—14-a zi a infecției numărul celulelor desprinse de pe perețele recipientelor crește, în cca 50% a cazurilor, în aceste celule putem descoperi prezența virusurilor. În nucleul celulelor infectate cu virusul hepatitei A nu am găsit particule virale (fac excepție tulpinile cultivate simultan cu adenovirusul tip 3).

3. Morfologia și dimensiunea virusurilor cultivate pe celule KB este identică cu cea descrisă într-o lucrare anterioară (3). Particulele virale de 27—30 nm au fost găsite la 11 din cele 12 tulpini studiate. În ultrasecțiuni ele au un aspect sferic sau ușor hexagonal și un miez central dens. Frecvent pot fi observate virusuri fără nucleocapsidă (tulpinile F 32, F 185) fapt care ne-a atras atenția asupra apariției formelor incomplete de virusuri în cursul cultivării.

4. Din cele 12 tulpini izolate 11 corespund virusului A al hepatitei. iar față de agenții fizici și chimici se comportă ca și virusurile studiate în anii precedenți (9, 18).

Prin reacția de imunoprecipitare a putut fi precizată identitatea antigenică a șase tulpini (F 32, F 122, F 123, F 277, F 279 și F 282). Menționăm că aceste tulpini atît din punct de vedere morfologic cît și antigenic se comportă la fel ca virusurile izolate în ultimii cinci ani (F 41, Hs 466, M-133, F 265), (9, 18).

#### Discutarea rezultatelor

Folosind diferite linii celulare este posibilă cultivarea virusului hepatitei A. fapt menționat într-o serie de lucrări (1, 18, 19, 12, 13).

Deși ECP deseori lipsește, sau poate fi observat cu greu în citoplasma celulelor infectate după o cultivare prelungită (7—14 zile) apar particulele virale în special în interiorul unor vacuole.

Din punct de vedere morfologic aceste virusuri în ultrasecțiuni au formă sferică, însă la o mărire de peste 250 000 X apare aspectul hexagonal al nucleocapsidei. Din unele particule lipsește miezul central. Dimensiunea lor în general este de 28—30 nm, dar în condiții de cultivare pot să apară particule mai mici sau mai mari (15—30 nm sau 40—45 nm).

Menționăm că virusul hepatitei B în culturi de celule prezintă forme între 40—100 nm, prin urmare variația de dimensiune a virusurilor hepatitei A și B în culturi de celule pare a fi frecventă.

Sînt interesante observațiile unor autori japonezi ca Tomatsu și colab. (20), care în serul și lichidul de ascită al bolnavilor cu hepatită găsesc un antigen de natură lipoproteică — numit antigen Arai — avînd formă sferică și dimensiuni de 10—50 nm, cele mai numeroase fiind de 20—30 nm. Particulele virale care au putut fi găsite deseori în celulele infectate cu serul sau materialele fecale ale bolnavilor au dimensiuni identice cu cele sus-amintite (1, 5, 9, 18, 19).

După aspectul replicării, virusul hepatitei A nu se aseamănă cu enterovirusurile, însă este rezistent la eter, rezistă timp de 30 de minute la 60° C, poate fi inactivat prin formol 1/4000 în 10 zile la 37° C (19), replicarea fiind inhibată de hidroxibenzolbenzimidazol (3), nefiind influențată de BUDR (18). Particulele virale conțin ARN (5, 19).

### Concluzii

1. Pentru izolarea virusului hepatitei A pot fi utilizate celulele liniei KB în care, după 7—14 zile apar particulele virale caracteristice pentru virusul hepatitei A.

2. Majoritatea virusurilor au dimensiuni de cca 28—30 nm, formă sferică, sînt relativ rezistente la 60° C, rezistente la eter. Genetron și pot fi inactivate prin formol.

3. Avînd în vedere localizarea frecventă a acestor virusuri în interiorul vacuolelor citoplasmatică precum și dimensiunea lor foarte redusă, examinarea electronmicroscopică a celulelor infectate cu produsele patologice ale bolnavilor, constituie o metodă valoroasă a diagnosticului etiologic al hepatitei de tip A.

### Bibliografie

1. László I., Péter M., Filep V., Abrahám A., Bálint E., Paál Györgyi, Domokos L., Kasza L., Bedő S.: Rev. med. (1962), 8, 1, 47; 2. László I., Péter M., Filep V., Abrahám A., Bálint E., Paál Györgyi, Domokos L., Kasza L., Bedő S.: Stud. cerc. inframicrobiol. (1962), 13, 3, 313; 3. László I.: Rev. roum. inframicrobiol. (1969), 6, 4, 263; 4. László I., Filep V., Munteanu P. Sanda, Both Iuliana: Rev. med. (1972), 18, 1, 32; 5. László I., Péter M., Filep V., Bálint E., Abrahám A., Izsák A., Almási Susana, Sabău Monica, Kasza L.: Rev. med. (1964), 10, 3, 280; 6. Wiener F., László I., Székely K.: Experientia (1967), 23, 84, 1; 7. László I., Kasza L., Munteanu P. Sanda, Filep V.: Rev. med. (1970), 16, 2, 165; 8. László I., Munteanu Sanda, Filep V., Kasza L.: Rev. med. (1970), 16, 3—4, 337; 9. László I., Both Iuliana, Filep V.: Rev. med. (1977), 23, 2, 99; 10. László I., Filep V., Almási Susana: Rev. roum. inframicrobiol. (1968), 5, 1, 49; 11. László I., Péter M., Filep V., Kasza L., Almási Susana, Both Iuliana, Nagy A.: Rev. med. (1962), 8, 3, 321; 12. Provost P. J., Hilleman M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1979), 160, 2, 213; 13. Frösner G. G., Deinhardt F., Scheid R., Gauss-Müller V., Holmes N., Messelberger V., Siegl G., Alexander J. J.: Hepatology (1980), 209. Rapid Literature Review I. Falk Found: 14. Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purcell R. H.: Science (1973), 182, 1026; 15. Provost P. J., Wolanski B. S., Miller W. J., Ittensohn O. L., Mc Aler W. J., Hilleman M. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1975), 148, 532; 16. Siegl G.: Internat. Symposium on Viral Hepatitis. April 5—7, 1979; 17. Krugman S., Gocke B. J.: Viral Hepatitis. Vol. XV. W. B. Sanders Co, 1978; 18. László I., Both Iuliana, Filep V., Palencsár A., Piros Sanda: Rev. med. (1979), 25, 1—2, 6; 19. László J., Bálint E., Filep V., Péter M., Abrahám S., Almási Susanne: Nature (1965), 207, 326; 20. Tomatsu J., Nanba Y., Morimoto T., Furuta S., Kiyosawa K., Komatsu H.: Acta Hepatol. Jap. (1979), 20, 5, 458.



*I. Iászló, Iuliana Both, V. Filep, Sanda M. Piros*

## **OBSERVATIONS CONCERNING THE CULTIVATION OF HEPATITIS VIRUS A ON THE KB CELLULAR LINE**

To isolate hepatitis virus A from faeces of hepatitis patients, as well as to make successive steps in studying virus strains, the cells of line KB can be used, in which after 7—14 days viral particles appear, characteristic of hepatitis virus A. Most viruses generally to be found within the cytoplasmic vacuole have a size of about 28—30 nm, icosohedral shape, they are resistant for 30 minutes to 60° C ether, Genetron. Their replication is influenced by 5-bromo-2-desoxyuridine. The viruses can be inactivated by formol in 10 days at 37° C. Taking into account the unusual replication of these viruses, we consider that the electronmicroscopic examination of the cells infected with pathologic products from the patients constitutes a valuable method in the diagnosis of hepatitis A.

*Sosit la redacție: 13 noiembrie 1980*

---