

## OBSERVAȚIILE NOASTRE ÎN LEGĂTURA CU CULTURA VIRUSULUI POLIOMIELITEI

László János, Kiss Ervin

Aplicarea pe scară largă a procedeelor de cultură pe țesuturi a promovat în mare măsură, în cercetările de virologie cunoașterea virusurilor și a făcut posibilă lămurirea patologiei multor boli.

În legătură cu pregătirea culturilor de țesuturi recomandăm cărțile de specialitate (1, 20, 2, 10, 17, 14) care pot da un ajutor serios virologilor.

Cultura cu succes a virusului poliomielitei a fost relatată de *Enders* și colab. în anul 1949 (6) și în anii următori (18, 7, 8). După aceea, au urmat cercetările virologilor canadieni în acest domeniu, *Duncan, Franklin, Wood* și *Rhodes* (5). În anul 1953, *Barski, Endo* și *Mocani* (3) iar mai târziu tot ei și *Lépine*, precum și *de Brion* (4) au aplicat țesut de amigdală umană la cultura virusului poliomielitei. Eforturile lor au fost încununate de succes. Ei au stabilit că culturile de fibroblast uman sînt apte pentru proliferarea virusurilor. În cursul anilor următori, aproape în fiecare țară s-a practicat cultura virusului poliomielitei. În Uniunea Sovietică *Jacek K.* (11), *M. K. Vorosilova* (19) și *V. I. Jevandrova* (12) se ocupă cu izolarea acestui virus, folosind culturile de țesuturi umane. De asemenea, în Republica Populară Ungară au apărut multe lucrări în legătură cu această problemă (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Pentru cultura virusului poliomielitei sînt utilizabile următoarele procedee:

- a) Procedeul tubului rotativ
- b) procedeul în culturi cu tub static
- c) în tulpini tumorale HeLa
- d) în țesuturi adică în celule în suspensie
- e) procedeul Dulbecco.

Deoarece în cursul cercetărilor noastre ne-am ocupat numai cu culturile în tuburi statice și cu culturile de țesuturi în suspensie vom aminti cîteva cuvinte numai despre acestea.

Posibilitatea de cultură prin procedeul tuburilor statice a virusului poliomielitei a fost relatată în 1952 de *W. F. Scherer* și *J. T. Syverton* (16), iar în 1953 de *C. P. Li* și *W. Schaeffer* (13). Procedeul constă în esență în aceea că fragmentele de țesut ce urmează să fie cultivate, sînt fixate în eprubete cu ajutorul plasmii coagulate și după adăugarea mediului de cultură eprubetele sînt ținute în poziție nemișcată pe stative corespunzătoare tot timpul cît durează cultura. Schimbarea mediului de cultură ce se face din 2 în 2 zile asigură alimentația bună a țesuturilor și evitarea acumulării produselor metabolice.

*Enders* și colab. (6) au fost primii care au vorbit despre cultura țesuturilor în suspensie. La drept vorbind, culturile de țesuturi în suspensie se pregătesc după modelul culturilor Maitland. Acest din urmă procedeu, însoțit de o bună experiență profesională, este foarte apt pentru izolarea virusului și pentru obținerea unei suspensii virotice masive.

În cele ce urmează vom prezenta cercetările noastre.

1. După cum am amintit, în cursul experiențelor noastre am aplicat procedeul culturii de țesuturi pe tuburi statice și al țesuturilor în suspensie, în vederea culturii virusului poliomielitei.

a) Culturile de țesuturi în tuburi statice. În acest scop, s-au dovedit foarte bune eprubetele fabricate din sticlă de Jena neutră. Aceste eprubete au fost confecționate de noi. Pentru culturi care durează mai puțin timp, sînt bune și eprubetele obișnuite, cu condiția ca reacția lor să nu fie prea alcalină, iar schimbarea mediului de cultură să se efectueze tot a doua zi. Am mai folosit pentru cultura țesuturilor tuburile cu marca RAL, care au un fund lat, adică o suprafață mare, fapt care favorizează creșterea țesuturilor. Eprubetele au fost așezate pe niște stativ confectionate de noi, în așa fel încît ele să formeze cu baza stativului un unghi de 5 grade. În acest mod, stratul subțire al mediului de cultură care acoperea țesuturile nu a ajuns în contact cu dopul.

O condiție fundamentală a succesului culturii este curățirea minuțioasă a vaselor de sticlă. Pentru a elimina orice urmă de impuritate, toate eprubetele noi și cele întrebuințate au fost fierte timp de o oră, în apă cu leșie de săpun de potasiu, apoi spălate și clătite cu cea mai mare grijă. După aceea, eprubetele au fost puse timp de 24 ore într-o soluție de acid sulfuric 20%, pe urmă spălate cu apă de la robinet și clătite de 3 ori cu apă distilată. Reacția ultimei ape cu care s-a făcut clătirea a fost controlată cu ajutorul indicatorului universal sau al hîrtiei de turnesol. După uscarea lor, eprubetele au fost sterilizate de 2 ori, la 180 de grade.

#### *Materiale necesare pentru cultură:*

1. Am cultivat țesuturi de embrioni umani în medie de 2—3 luni (plămîni, rinichi, mușchi, piele etc.) pe care le-am obținut de la clinica ginecologică din localitate. Fiecare embrion a fost transportat într-o soluție Hanks care conține antibiotice și, în limita posibilităților, prelucrarea lui s-a făcut imediat. Dacă aceasta nu s-a putut face, atunci am adăugat în soluția de transport plasmă umană sterilă, în cantitate de 40%, iar țesuturile au fost păstrate, pînă la utilizarea lor, într-un frigoriger la 4 grade. La pregătirea culturilor au fost spălate insistent cu soluție Hanks și tăiați în bucățele cu diametrul de 1—2 mm.

2. Plasma s-a obținut din singele recoltat de la găini, amestecîndu-l cu Heparină 1/1000 și centrifugîndu-l pînă la dispariția elementelor celulare. Plasma pură a fost depusă în eprubete mici, la temperatura de +4 grade C.

3. Extractele de embrion le-am obținut astfel: Embrionii de pui, incubăți timp de 10—12 zile, au fost spălați cu soluție Hanks care conține antibiotice, apoi a r fost tăiați și amestecați cu soluție Hanks din care s-a luat o cantitate potrivită mărîmii fiecăruia. Timp de 30 de minute, am lăsat preparatul la temperatura camerei, apoi l-am centrifugat pînă la dispariția elementelor celulare. Supernatantul a fost introdus în sticle mici cu penicilină pe care le-am conservat la +4 grade C.

4. Soluția Hanks are în compoziția ei NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glucoză și NaHCO<sub>3</sub>. În ceea ce privește pregătirea soluției, indicăm bibliografia de specialitate (4).

5. Lichidul amniotic l-am obținut de la abatorul din localitate. De obicei, a fost luat de la mai multe animale, iar lichidului absolut pur i s-a adăugat antibiotice. Acest lichid nu a fost păstrat mai mult de 2 săptămîni. Reacția sa nu poate depăși pH 8.

6. Serul steril cabalin a fost inactivat cu 30 de minute înainte de întrebuițare, la 56 de grade și depozitat la  $-20^{\circ}\text{C}$ .

7. Serul sanguin uman l-am primit de la centrul de colectare a singelui din Tg. Mureș; l-am trecut prin filtrul Seitz și apoi l-am păstrat la  $+4$  grade C.

8. Soluția de fenol roșu am preparat-o în concentrație de 0,1% și am păstrat-o în frigider. La 10 ml mediu de cultură gata preparat am dat înainte de întrebuițare 0,25 ml din această soluție.

*Prepararea culturilor.* Am așternut în eprubete sterile o picătură de plasmă sub forma unei dungii subțiri, apoi peste aceasta am așezat 6—8 bucăți de țesut. După aceea, am pipetat, pe partea superioară a dungii de plasmă, o picătură de extract de embrion; surplusul de soluție se scurge pe peretele eprubetei și de obicei plasma se coagulează în câteva minute. Unii autori introduc plasma pe toată suprafața eprubetei sub forma unui strat subțire, noi însă am acordat prioritate procedurii descris mai sus, deoarece bucata de țesut s-a fixat bine și nu s-a spălat în cursul schimbărilor mediului de cultură. În cazul în care celulele au ajuns la marginea dungii de plasmă ele au continuat să crească într-un strat subțire pe peretele neted al eprubetei și prin aceasta am obținut o cultură monostratificată. Aceste culturi s-au dovedit foarte apte pentru însămînțarea cu virusuri.

Pentru cultura țesuturilor am încercat numeroase medii de cultură cu o compoziție diferită: 1. Soluție Hanks 60%, ser sanguin uman 35%, extract de embrion 5%; 2. Soluție Hanks 60%, ser sanguin uman 40%; 3. Soluție Hanks 60%, ser cabalin inactivat 20%, lichid amniotic 20%; 4. Lichid amniotic 75%, ser cabalin inactivat 20%, extract de embrion de vacă 5% etc.

Noi credem că pentru cultura țesuturilor umane, cel mai bun mediu de cultură este cel indicat la nr. 1. Ridicarea pînă la 5—20% a concentrației extractului de embrion favorizează creșterea culturilor de fibroblast. La culturile de țesuturi noi am pipetat, în funcție de mărimea eprubetei, atîta mediu de cultură încît acesta să nu acopere țesuturile decît cel mult pe o grosime de 1—2 mm. Acest fapt este foarte important din punctul de vedere al alimentării cu oxigen a țesuturilor. După introducerea mediului de cultură, am închis eprubetele cu dopuri sterile de cauciuc, netoxice, învelite în celofan.

*Urmărirea culturilor.* De obicei creșterea țesuturilor începe în primele 24 de ore. Aceasta e semnalată de reacția acidității, adică de îngălbenirea roșului de fenol. Creșterea trebuie controlată de fiecare dată cu ajutorul microscopului. După 48 de ore, trebuie să se schimbe mediul de cultură, deoarece reacția scăzută care durează mult timp provoacă o degenerare nespecifică a celulelor. În general obținem culturi mixte, ceea ce înseamnă că pe lângă fibroblaști apar și celulele epiteliale. În cursul experiențelor noastre am preparat și culturi pure de țesuturi. În a 5—6-a zi, culturile au devenit apte pentru însămînțări cu virusuri. Bucățile de țesuturi care nu se dezvoltă și acelea unde se poate vedea o degenerare nespecifică a celulelor, trebuie îndepărtate în condiții sterile. Am observat că în cursul culturilor efectuate mai mult de 12 zile am obținut mai multe culturi de fibroblast cu un singur strat, decît la cele de 5—6 zile, și că acestea se pot însămînța cu succes (fig. 1., fotografiile ale diferitelor culturi).

Înainte cu două zile de însămînțarea țesuturilor cu virusuri, am spălat culturile care conțin ser uman cu soluție Hanks, înlocuindu-le cu următorul mediu de cultură: soluție Hanks 85%, ser cabalin inactivat 10%, lichid amniotic 5%. scopul acestei schimbări fiind acela de a înlătura anticorpii neutralizanți care eventual ar fi fost prezenți în serul sanguin uman.

*Însămînțarea țesuturilor cu virusuri.* Pentru însămînțarea țesuturilor am întrebuițat în experiențele noastre tulpinile poliomielitice Mahoney (I), MEF<sub>1</sub> (II) și Saukett (III), care ne-au fost puse la dispoziție de către Institutul de Infamicrobiologie al Academiei R.P.R. și de către Laboratorul Republican de

Cercetări Virologice din Budapesta. Din virusuri am pipetat 0.2 ml în culturile care au prezentat un grad corespunzător de dezvoltare; pentru fixarea virusurilor, aceste culturi au fost ținute timp de o oră la 37° C, apoi am introdus 1,8 ml de mediu de cultură, compoziția acestuia fiind următoarea: soluție Hanks 85%, ser cabalin inactivat 10%, lichid amniotic 5%.

*Semnele înmulțirii virusului.* În prezența virusurilor, celulele se degradează, iar reacția mediului de cultură se intensifică. În condiții identice, în eprubetele de control, degenerarea celulelor nu se produce. Deoarece reacția citopatogenă a unor tulpini nu apare decât după 4—7 zile, pentru evitarea degenerării nespecifice a celulelor, în ziua a 4-a se poate efectua o schimbare a mediului de cultură. Din eprubetele care au prezentat o degenerare completă, am extras mediul de cultură și l-am conservat prin congelare (în fotografiile alăturate se poate vedea degenerarea celulelor).

În cursul experiențelor noastre am preparat următoarele culturi de țesuturi

1. Cultură de țesut renal	13 serii
2. „ „ „ pulmonar	21 „
3. „ „ „ muscular	12 „
4. „ „ „ tegumentar	3 „
5. „ „ „ hepatic	4 „

Total: 53 serii

Fiecare serie a avut cel puțin 8 eprubete, unele însă 40. Pentru cultura virusurilor am folosit numai cele mai bune culturi. Alături de aceste serii am preparat cel puțin 6 grupe de control. Cultivând virusurile am constatat că în culturile de fibroblast cu un singur strat, virusurile se înmulțesc tot atât de bine ca și în culturile de celule epiteliale ale rinichilor. La efectuarea primelor pasaje virusurile cultivate au fost citopatogene în concentrație de  $10^{-3}$ , iar mai târziu  $10^{-5}$ .

Am examinat de asemenea patogenitatea animală a virusurilor cultivate, dar rezultatele pe care le-am obținut vor constitui subiectul unei alte comunicări.

*Cultura virusului poliomielitei în țesuturi în suspensie.* Într-un borcan Erlenmeyer preparat dintr-o sticlă de Jena de 25—50 ml introducem 25—30 bucăți de țesut uman tăiat mărunt și adăugăm cca 3 ml de mediu de cultură. Ținem astfel preparatul timp de 24 de ore la o temperatură de 37° C, apoi schimbăm mediul de cultură. În cursul culturii e necondiționat nevoie ca mediul de cultură să fie schimbat tot a doua zi. În ziua 2—4-a am însămințat țesuturile în mod obișnuit cu virusuri. Înmulțirea virusurilor a început de obicei între ziua a 2—10-a, fapt semnalat de ridicarea pH-ului mediului de cultură. Înmulțirea virusurilor am controlat-o prin însămințarea culturii în tuburi statice.

În primul rând, cultura în țesuturi în suspensie este aptă pentru izolarea virusurilor și pentru obținerea unor cantități mai mari de virusuri.

### Rezumat

1. În cursul experiențelor noastre am aplicat cu succes pentru cultivarea virusului poliomielitei, 53 de serii de culturi de țesuturi umane în tuburi statice.

2. Pe calea culturii țesuturilor umane prin dungii subțiri de plasmă, se pot obține culturi de fibroblast cu un singur strat, apte pentru înmulțirea virusului poliomielitei. În timpul incubației, culturile se pot urmări ușor.

3. Cultura în celule și țesuturi în suspensie este foarte aptă pentru obținerea unor suspensii virotice masive.

4. Virusul poliomielitei (MEF<sub>1</sub>) cultivat în țesuturi umane își păstrează patogenitatea față de animale.

5. Cultura virusului poliomielitei în tuburi statice și în celule suspendate poate fi aplicată ca un procedeu de uz curent.

*Sosit la redacție: la 5 aprilie 1958.*

La sîrşitul comunicării noastre preliminare exprimăm mulţumiri pentru ajutorul ce ni l-a dat prof. universitar dr. *Lőrincz E. András*, conducătorul clinicii de ginecologie din Tg-Mureş, doctor în ştiinţele medicale, şi colectivului său de muncă, apoi dr. *Takátsy Gyula* conducătorul secţiei de virologie de la Institutul de cercetări din Budapesta, şi dr. *I. Aderca*, conducătorul secţiei de cultura (feturilor de la Institutul de inframicrobiologie din Bucureşti pentru bunăvoinţa cu care ne-au pus la dispoziţie tulpinile poliomielitice.

#### Bibliografie

1. *Fischer A., Laser H.*: Weitere Fortschritte in der Züchtung vor Warmblütergewebezellen in vitro. Handbuch der Biol. Arbeitsmethoden. Abt. V. Teil 1, 1930; 2. *Bisceglie A., Juhász-Schäffer*: Die Gewebezüchtung in vitro. Berlin, 1928, Julius Springer Verlag; 3. *Barski M., Endo V. Monaco*: Ann. Inst. Pasteur. 1953, 1—3, 265; 4. *Pariski P., Lépine V., Mocani G., de Brion*: Ann. Inst. Past. 1953, 5, 826; 5. *Duncan P., Franklin A. E., Wood W., Rhodes A. J.*: Canad. J. Med. Sci. 1953, 31, 75; 6. *Enders J. F., Weller T. H., Robbins F. C.*: Science 109, 85, 1949; 7. *Enders J.*: Immunology, 1952, 69, 629; 8. *Enders J.*: Immunology 1952, 69, 673; 9. *Enders J. F.*: Techniques de culture de tissus appliquées actuellement a l'étude des virus poliomyelitiques. La poliomyélite. OMS. Genève. 1955, Masson et Cie Paris 279; 10. *Ephrussi B.*: La culture des tissus Paris, 1932, Gauthier-Villiers et Cie Edit; 11. *Jacek K.*: Voprosi virusologhii 1956, 2; 12. *Jevandrova V. J.*: Voprosi virusologhii 2, 1956, 13. *Li C. P., Schaeffer M.*: 1953, Science, 118, 107. 14. *Parker R. C.*: 1950. Methods of tissue culture. 2nd. Ed. New-York; 15. *Rhodes A. J., Wood W., Duncan D.*: Les tests de laboratoire en particulier les techniques de culture de tissus dans le diagnostic de la poliomyélite. La poliomyélite. OMS. Genève 1955, Masson Cie Paris 245; 16. *Scherer W. F., Syverton J. T.*: 1952, Journ. Exp. Med. 96,369; 17. *J. Verne*: La vie cellulaire hors de l'organisme. La culture des tissus. G. Doim et Cie Paris 1937; 18. *Weller T. H., Enders J. F., Robbins F. C., Stoddard M. B.*: Journ. Immunology. 1952, 69, 645; 19. *Voroskova K.*: Voprosi virusologhii 1956, 1; 20. *Crăciun E. C.*: La culture des tissus en biologie expérimentale. Masson et Cie Paris, 1931; 21. *Orvosi Hetilap* 1954, 978; 22. *Orvosi Hetilap* 1955, 925; 23. *Orvosi Hetilap* 1955, 1429; 24. *Orvosi Hetilap* 1956, 396; 25. *Orvosi Hetilap* 1956, 869; 26. Acta Microbiologica T. IV. 197, 1957, Budapesta; 27. Acta Microbiologica T. IV. 353, 1957, Budapesta; 28. Acta Microbiologica T. III, 399, 1956, Budapesta.

#### НАШИ НАБЛЮДЕНИЯ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ВИРУСА ПОЛИОМИЭЛИТА Ласло Я., Киш Э.

Авторы для опытов использовали человеческую тканевую культуру в стоящих трубках. Самый хороший результат дали однослойные фибробластические культуры, которые легко наблюдаемы. Культивированный в человеческой культуре вирус (MEF<sub>1</sub> штамма) сохраняет свою патогенность на мышей. Для получения большого количества вирусной суспензии достаточно культивирование вируса во взвешенных клетках.

Культивирование вируса во взвешенных клетках в человеческой тканевой культуре в стоящих трубках простое, и поэтому может быть успешно использовано для изолирования вируса.

#### OBSERVATIONS SUR LA CULTURE DU VIRUS POLIOMYELITIQUE

*J. László et E. Kiss*

Les auteurs se sont servi au cours de leurs expériences, de cultures tissulaires humaines à tube fixés pour la cultivation du virus poliomyélitique. Les cultures de fibroblastes monostrates avaient données le meilleur résultat, pour cause de leur observabilité facile. Les virus, cultivés dans un milieu de tissu humain (le vire de la souche MEF<sub>1</sub>) gardent leur pathogénité envers la souris. La cultivation en suspension cellulaire convient aussi à obtenir de quantités massives de suspension virotique.

La cultivation du virus dans des cultures à tubes fixe et dans de la suspension cellulaire sont les méthodes qui conviennent le mieux pour isoler le virus.



Fig. nr. 1.

Cultură de țesut din mușchi uman. Pre-  
parat nativ. Cultură de 48 ore. Măr. 240 x.



Fig. nr. 2.

Cultură de țesut uman de 3 zile. Prepa-  
rat nativ. Măr. 240 x.



Fig. nr. 3.

Cultură de țesut uman de 7 zile. Prepa-  
rat nativ. Cultură de țesut din fibroblast  
monostratificat. Măr. 240 x.



Fig. nr. 4.

Cultura de țesut uman de 7 zile. Prepa-  
rat nativ. Fibroblast stratificat. Măr. 240 x.



Fig. nr. 5.

Cultură de țesut uman de 7 zile, după 48 ore de la inoculare cu virusul poliomieltic (tulp. Maboney I.) Preparat nativ. Destrucția parțială a celulelor. Măr. 240 x.



Fig. nr. 6.

Cultură de țesut uman de 7 zile, după 72 ore de la inoculare cu virusul poliomieltic (tulp. Maboney I.) Preparat nativ. Destrucția totală a celulelor în zona marginală a culturii. Măr. 340 x.