

Catedra de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: J. László, șef de lucrări), Clinica de boli contagioase (cond.: prof. L. Kelemen) și Catedra de biologie (cond.: prof. K. Székely) ale I.M.F. din Tirgu Mureș

EXPERIENȚE PENTRU IZOLAREA VIRUSULUI HEPATITEI EPIDEMICE*

J. László, M. Péter, Gy. Filep, S. Abrahám, E. Bálint, Paál Györgyi, L. Domokos, L. Kasza și S. Bedő

Diagnosticul etiologic al hepatitei epidemice întâmpină greutăți, deoarece majoritatea cercetărilor referitoare la izolarea virusului și la utilizarea acestuia în stabilirea diagnosticului nu au dat rezultate concordante.

În ultimii ani, la izolarea virusurilor se întrebunțează din ce în ce mai mult culturile de țesuturi, mai ales după rezultatele obținute în domeniul cercetărilor poliomielitice.

Primele examinări în legătură cu cultivarea virusului hepatitei epidemice au fost efectuate de Henle și colab. (1). Acești autori au însămînțat filtratul fecalelor bolnavilor de hepatită pe culturi de țesuturi, de embrion de găină (tip Maitland) și au efectuat culturi de ficat de iepure tânăr într-un sistem cu tuburi rulante. Cu ajutorul lichidului culturilor de țesuturi infectate, s-a putut provoca hepatită. Rezultatele examenelor serologice au rămas negative în cursul acestor experiențe.

Morzycka și colab. (2) susțin că utilizând serul sanguin obținut din faza timpurie a bolii, au putut să cauzeze în celulele HeLa un efect citopatogen care a apărut în ziua 7—14 după infecție. Folosind metoda lor, au izolat 10 tulpini de virus. Rightsell și colab. (3) au relatat în 1956 fenomene citopatogene observate în culturile celulare Deiroit-6 infectate cu materii hepatitice. Experiențele de sero-neutralizare au confirmat specificitatea acțiunii citopatogene.

La noi în țară I. Aderca, M. Iancovescu și A. Friedman (4) au încercat să cultive virusul pe culturi de țesuturi de tip Maitland, dar rezultatul experiențelor a fost negativ.

V. Kubelka și colab. (5) au izolat din materii hepatitice o tulpină patogenă pentru șoareci (tulpina Motol) stabilind că mărimea corpusculilor elementari este de 100—200 milimicroni.

În ciuda acestor rezultate pozitive, procedeele aplicate de autorii amintiți nu s-au răspândit, deoarece nu au putut fi confirmate decât parțial.

Șt. S. Nicolau (6) într-o lucrare apărută în 1957 ca și în studii publicate mai recent (7, 8, 9) a arătat rezultatele contradictorii obținute în cursul diagnosticului de laborator, atribuindu-le variației virusului. Ca urmare a variației naturale a virusului, apar tipuri noi, care cu ajutorul procedeele aplicate anterior nu mai pot fi puse în evidență. O atenție deosebită trebuia acordată observației lui Nicolau (7), potrivit căreia în cursul izolării virusului trebuie să contăm pe prezența eventuală a virusurilor biofite. Acest fapt poate să ducă la rezultate eronate.

Noi am început cercetările în 1958. Scopul urmărit a fost acela de a elabora o metodă de laborator, care să facă posibil diagnosticul etiologic al cazurilor de hepatită. Într-o lucrare anterioară am relatat rezultatele obținute în această privință (10).

* Comunicare prezentată la ședințele din 28 noiembrie și 16 decembrie ale S.Ș.M. Secția de patologie infecțioasă.

Experiențe pentru izolarea virusului.

Material și metodă.

De la bolnavii suferind de hepatită epidemică am prelevat sînge în faza timpurie a infecției și din serul sanguin steril obținut am însămițat 0,2 ml pe culturi de țesuturi.

Pentru culturile de țesuturi am utilizat țesut hepatic trîpsîmizat de foetus uman de 4—6 săptămîni și țesuturi de embrion de gîmă de 10 zile.

La culturile de țesuturi am întrebuițat medii avînd următoarea compoziție:

Soluția Hanks	79%
Ser de vițel	20%
Hidrolizat de lactalbumină	0,5%
Glutamină dl.	1% (dintr-o soluție de 200 mM)

După efectivarea unei culturi de 4—5 zile, mediile au fost infectate cu 0,2 ml ser sanguin. Pentru cultura virusurilor am folosit următorul mediu:

Soluție Hanks	97,5%
Ser de vițel	2,5%
Hidrolizat de lactalbumină	0,5%
Glutamină dl.	1% (dintr-o soluție de 200 mM)

Cultura a fost efectuată în tuburi staționare și în tuburi rulante. După 7—12 zile de la infecție, am observat un efect citopatogen în culturile infectate. Acest efect a lipsit în culturile normale. Lichidul supernatant al culturilor infectate a fost utilizat pentru examinări electronmicroscopice și reacția de fixare a complementului.

La prelucrarea materiilor fecale ale bolnavilor de hepatită aceste materii au fost triturate cu o soluție de tampon, apoi trecute prin filtru Seitz SKS și 0,2 ml din filtrat l-am însămițat pe culturi de țesuturi.

Purificarea supernatantului culturilor de țesuturi am efectuat-o cu ajutorul ultrafiltrării. Metalizarea preparatelor s-a făcut cu paladiu sau aur. Toate examinările au fost efectuate cu electronmicroscop de masă TESLA BS 242 A.

Rezultate.

Intr-o anumită parte a culturilor de țesuturi, infectate cu serul sanguin al bolnavilor de hepatită, s-au pus în evidență corpusculi de 15—70 milimicroni, sferici asemănători corpusculilor elementari. Particule similare am găsit și în culturile de țesuturi infectate cu filtrat din materii fecale (figura nr. 1).

Am studiat și hematitele bolnavilor de hepatită, pentru a stabili dacă virusul în sînge aderă sau nu de suprafața acestora. Cu ajutorul electronmicroscopului am reușit să punem în evidență pe suprafața hematiilor, particule de 10—20 milimicroni. Astfel de formații nu am găsit pe suprafața hematiilor la persoanele sănătoase (figura nr. 2).

Rezultate interesante a dat studierea lichidului c. r. al bolnavilor de hepatită. În lichidul c. r. al bolnavilor în comă hepatică am găsit corpusculi elementari, sferici avînd în medie o mărime de aprox. 70 milimicroni (figura nr. 3).

Lichidul culturilor de țesuturi examinat l-am utilizat ca antigen pentru reacția de fixare a complementului.

Reacția de fixare a complementului.

Reacția de fixare a complementului a fost efectuată potrivit metodei descrise în cartea lui N. Cajal (11).

Material de examinat	Titrul și nr. cazurilor								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Negativ	Total
Ser hepatic	12	6	11	4	6	6	8	22	75
Ser normal	8	2	3	0	1	—	—	61	75

În legătură cu datele din acest tabel, notăm că serul sanguin derivînd de la persoane așa-zise sănătoase, l-am primit de la diferite clinici, exceptînd 14 cazuri.

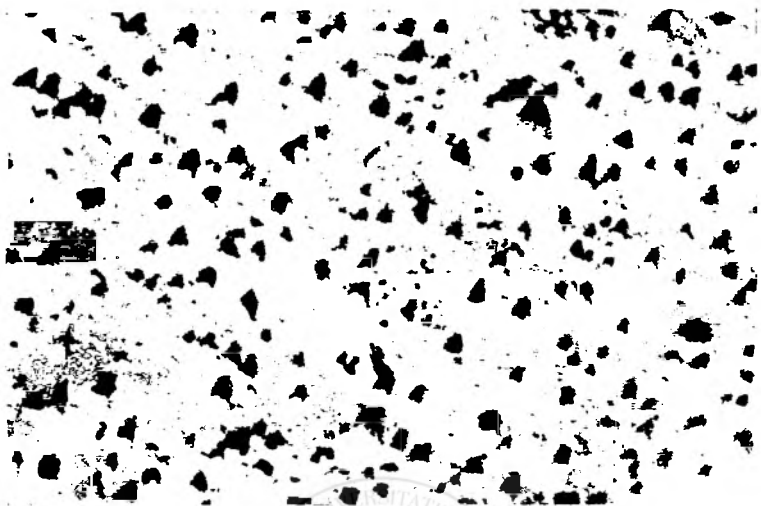


Figura nr. 1: - imagine mărită de 22.000 ori.



Figura nr. 2: - imagine mărită de
55.800 ori.

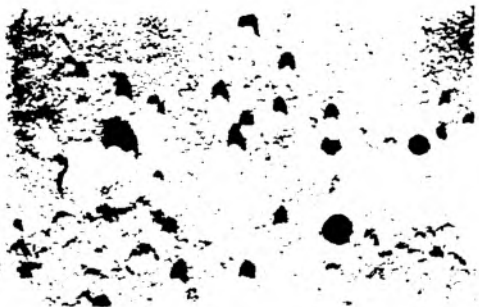


Figura nr. 3: - imagine mărită de
20.000 ori.

În cursul experiențelor de izolare a virusului, repetate de mai multe ori cu ser sanguin și filtrat de materii fecale de la bolnavii de hepatită, am reușit să punem în evidență particule de 15—70 milimicroni, sferice, similare corpusculilor elementari. Particule de o formă și mărime asemănătoare am găsit și în lichidul c. r. al bolnavilor de hepatită.

Cele mai bune rezultate le-am obținut cu serul sanguin al bolnavilor de 1—3 zile și am reușit să punem în evidență corpusculi elementari, aproximativ în 50% a cazurilor.

Este surprinzător însă că pe suprafața hematiilor provenite din faza timpurie a bolii am găsit particule de 10—20 milimicroni. În schimb, în culturile de țesuturi au fost și formații mai mari care au dominat numeric (particule de aproximativ 70 milimicroni). Cele mai multe formații cu aspect de corpuscul elementar, întâlnite în lichidul c. r. au avut o mărime asemănătoare cu aceea a particulelor observate în culturile de țesuturi. În vederea studierii acestei probleme vom face alte cercetări.

Dorim să menționăm că *Rightsell* și colab. susțin în lucrarea lor apărută recent (12) că virusul hepatitei epidemice este o particulă avind o mărime de 12—18 milimicroni. De asemenea *V. A. Ananiev* și *A. K. Subladze* (13) relatează experiențe de izolare a virusului efectuate cu succes, dar acești autori nu au întreprins cercetări electronmicroscopice.

Noi am efectuat reacția de fixare a complementului în 150 de cazuri. Ca antigen, am utilizat lichidul culturilor de țesături infectate cu materii hepatice. Rezultatele obținute vin în sprijinul supoziției noastre că particulele de 15—70 milimicroni pe care am reușit să le izolăm au rol în hepatita epidemică.

Concluzii:

În cursul cercetărilor noastre, am infectat cu ser sanguin hepatitic și cu filtrat din materiile fecale culturi de țesuturi de embrion de găină și țesut hepatic embrionar uman. În lichidul acestora, la examenul electronmicroscopic am pus în evidență particule sferice de 15—70 milimicroni, similare corpusculilor elementari. Particule cu formă și mărime asemănătoare am găsit și în lichidul c. r. al bolnavilor de hepatită.

Pe suprafața hematiilor bolnavilor de hepatită am observat de asemenea particule similare cu corpusculii elementari. Cele mai multe din acestea au avut o mărime de 10—20 milimicroni.

Rezultatele reacției de fixare a complementului efectuată cu serul sanguin al bolnavilor confirmă supoziția noastră, potrivit căreia particulele izolate au rol în hepatita epidemică.

Sosit la redacție: 11 ianuarie 1962.

Bibliografie

1. HENLE W., HARRIS S., HENLE G., HARRIS T., DRAKE M., MANGOLD FR., and STOKES J.: *J. exp. Med.* (1950) 92, 271; 2. MORZYCKA și colab.: cit. ADERCA
3. RIGHTSELL W. A. și colab.: *Science* (1956) 124, 226—228; 4. ADERCA I., M. IANCOVESCU și A. FRIDMAN: Studii și cerc. de inframicrobiol. și parazit. (1958) 2, 233—251; 5. KUBELKA V., SLAVIK K., SOUSEK O., BARTH P.: *Acta Univ. Carolinae. Serv. Med.* (1959) Suppl. 7, 460—473; 6. ȘT. S. NICOLAU: Hepatitele infecțioase inframicrobiene (1957) Edit. Acad. R.P.R.; 7. ȘT. S. NICOLAU: Studii și cerc. de inframicrob. (1961) XII, 2, 185—193; 8. ȘT. S. NICOLAU, N. CAJAL: *Giorn. di Malattie Infett. e Parassit.* 1960 9—10 486—491; 9. ȘT. S. NICOLAU, S. BIBERI—MOROIANU, N. CAJAL: *Giorn. di Malattie Infett. e Parassit.* 1960, 9—10, 492—499; 10. I. LÁSZLO, A. ABRAHAM, M. PETER, E. KISS, L. DOMOKOS, MARGIT MAKAI, EVA SZENTKIRALYI, F. KOVATS: *Revista Medicală* 1961 2, 171—173; 11. N. CAJAL: *Diagnosticul de laborator al inframicrobiologiei umane* (1958), Edit. Acad. R.P.R.; 12. RIGHTSELL W. A., RUTH A., KELTSH, A. R. TAYLOR, J. D. BOGGS, Wm. Mc. LEAN: *J. A. M. A.* (1961) 177 10, 671—682; 13. ANANIEV V. A., A. K. SUBLADZE: *Voprosi Virusologii* (1961) 5, 538.