

Catedra de microbiologie și inframicrobiologie (cond.: șef de lucrări I. László)
și Clinica de boli contagioase (cond.: prof. L. Kelemen) ale I.M.F. din Tîrgu-Mureș

CERCETĂRI ELECTRONMICROSCOPICE ÎN HEPATITA EPIDEMICĂ

I. László, M. Péter, V. Filep, I. Kasza, Susana Almási, Iuliana Both, A. Nagy

Aplicarea pe scară largă a metodelor electronmicroscopice (e. m.) și de cultivare a țesuturilor a contribuit considerabil la dezvoltarea cercetărilor efectuate pentru punerea în evidență a agentului patogen al hepatitei epidemice (h. e.).

În afară de studiile mai vechi (9, 15, 18, 14, 17) recent au fost publicate numeroase lucrări, care au deschis noi posibilități în studiul agentului patogen (16, 13, 3, 2).

Cercetările întreprinse sînt completate cu examinări histopatologice efectuate la microscopul electronic, în hepatitele virotice (7, 8, 5, 6, 4, 10).

Incerările reușite de izolare a virusului ilustrează că prin aplicarea unei metode convenabile este posibilă cultivarea virusului h. e. (16, 13).

În lucrarea de față ne ocupăm nu numai de cultivarea virusului, ci și de cercetările histopatologice făcute la microscopul electronic, îmbrățișînd și experiențele noastre pe animale, care au constituit obiectul unei lucrări anterioare (12).

Material și metodă

1. Pentru izolarea virusului h. e. am folosit următoarele culturi țesuturi: celule Detroit-6 și KB, țesuturi de ficat și rinichi tripsinizate, provenite din fetusuri umane de 4-5 luni, și țesuturi de embrion de găină de 9-11 zile.

Tripsinizarea țesuturilor umane a fost efectuată cu metoda obișnuită. Din embrionul de găină celulele necesare au fost obținute cu ajutorul unei prese de embrion, țesuturile fiind suspendate în mediul de cultură: după sedimentarea fragmentelor mai mari prin centrifugare, celulele au fost introduse în eprubete.

Pentru cultivare am întrebuințat mediul recomandat de I. Aderca și M. Ianconescu (1): Soluția Hanks+Earle în proporții egale 34%, 2,5% lactalbumină NBC₀ 20%, ser de vițel 10%, l-glutamina 200 mM 1%, streptomicină 100 gama/ml, penicilină 200 U/ml, micostatină 30 U/ml. Acest mediu a fost modificat de noi prin înlocuirea serului de vițel cu ser fetal bovin, care este netoxic față de culturile celulare.

2. Am utilizat ca materiale patologice sînge, materii fecale, recoltate în primele 3 zile ale bolii, de la bolnavi, care au fost declarați din punct de vedere clinic, hepatitici.

Materiile fecale au fost triturate cu tampon SST, iar după centrifugare au fost tratate timp de 10 minute la 60°C, pentru inactivarea unor virusuri sensibile la căldură. Serurile au fost tratate în mod similar. Culturile celulare au fost infectate cu 0,2 ml material patologic, iar după un repaus de 30 de minute, la temperatura camerei, în fiecare eprubetă am adăugat 1,8 ml mediu de cultură.

3. Durata cultivării a fost 7-14 zile, deoarece în cercetările noastre anterioare am observat că un elect citopatogen moderat apare destul de tîrziu, după infectare. Cultivările au fost efectuate în tuburi staționare și în tuburi rulante.

Purificarea suspensiei virotice am făcut-o prin ultrafiltrare, suspensia fiind însă tratată în prealabil cu sulfat de amoniu. Materialul virotic a fost metalizat cu aur sau paladiu și examinat la microscopul electronic.

4. Pentru inoculări la animale am folosit hamsteri și embrioni de găină de 9-11 zile. Rezultatele obținute în cursul experiențelor cu găini sînt cuprinse într-o altă lucrare. Hamsterii au fost inoculați intrahepatic cu 0,1 ml dintr-o tulpină de virus izo-

lată de noi, tulpina RT 110; în unele cazuri aceste inoculări au fost repetate din 10 în 10 zile. După șase luni de la inoculare, ficatul animalelor a fost prelucrat pentru cercetări histopatologice și la microscopul electronic.

5. Pentru studiile e. m. ficatul obținut de la bolnavi prin biopsie, ficatul hamsterilor infectați cu virusul cultivat și celulele Detroit —6 infectate, au fost fixate după metoda Palade și incluse în metacrilat de metil și butil. Secțiunile ultrafine le-am efectuat cu ultramicrotomul Reichert, iar preparatele le-am examinat cu microscopul de masă Tesla BS 242 A, în Laboratorul de microscopie electronică al Institutului de medicină și farmacie din Tirgu Mureș.

Rezultate

În total au fost inoculate 80 de produse patologice provenite de la bolnavi de hepatită, pe culturi tisulare, din care 19 erau formate din filtrat de materii fecale și 61 din ser de bolnav. Din materiile fecale au fost izolate virusuri de 8 ori, iar din sînge de 9 ori, celelalte izolări fiind negative. Cea mai avantajoasă a fost cultivarea timp de 7—14 zile. Încă în 1957 am observat că culturile tisulare manifestă modificări patologice față de metoda obișnuită în cazul cînd cultivarea e prelungită. Nucleul celulelor hepatice pare a fi gol, în timp ce protoplasma devine vacuolizată. Agentul patogen se dezvoltă și în alte culturi celulare (Detroit—6, KB. țesut renal embrional uman, țesut de embrion de gîină) însă modificările patologice sînt minime, anevoios de interpretat. În unele cazuri pronunțate pe celulele renale de embrion uman sau embrion de gîină.

Cercetările morfologice le-am efectuat cu trei tulpini: cu o tulpină izolată din ser de bolnav (RT 110) și cu două tulpini izolate din materii fecale (S III și RT 303).

Cele mai bune rezultate le-am obținut prin culturile în tuburi rulante Tulpina RT 110 conține corpusculi elementari sferici de 15 milimicroni, care prin agregare formează corpusculi mai mari de 70 de milimicroni (Fig. nr. 1).

Corpusculi elementari de aceeași formă și mărime are tulpina S III, pe cînd tulpina RT 303 este alcătuită din particule virotice de 20—60 milimicroni. Agregarea particulelor se poate observa și în acest caz (Fig. nr. 2).

În afară de tulpinile studiate morfologic, pare interesantă o tulpină izolată din sînge cu corpusculi elementari în formă cocoidă de 80—90 milimicroni (Fig. nr. 3), precum și o tulpină cu corpusculi de 55—60 de milimicroni, izolată din culturile embrionare de gîină, infectate cu filtrat de materii fecale (Fig. nr. 4.)

Aceste două tulpini n-au fost supuse unor studii detaliate. Reacția de fixare a complementului, efectuată cu tulpinile izolate, a confirmat presupunerea noastră că particulele izolate de noi au un rol etiologic în h.e. (13).

Într-o parte a lucrărilor noastre ne-am ocupat cu studiul e. microscopic al culturilor de țesuturi infectate cu materiale patologice și cu tulpini de virusuri izolate. În culturile Detroit—6, infectate cu materiale hepatice domină degenerescența mitocondriilor (Fig. nr. 5) cu dezintegrarea structurii normale; totodată în ergastoplasmă apar corpusculi denși de 70 milimicroni, cu o morfologie similară corpusculilor elementari virotici.

Pentru examinările histopatologice cu microscopul electronic s-a prelucrat ficatul de la 3 bolnavi. În citoplasma celulelor am pus în evidență corpusculi denși, opaci de 60 milimicroni, care par a fi agregați din particule mai mici (Fig. nr. 6). Pe preparate nucleii sînt deformați, cu forme bizare, din cauza condensării probabile a materialului din nucleu; în interiorul nucleilor apar corpusculi asemănători virusurilor.

Cu materialul din pasajele 2, 3, 4 și 6 ale tulpinii RT 110 și cu tulpina RT 303 au fost inoculați 13 hamsteri pe cale intrahepatică; am obținut rezultate patologice pozitive la 4 animale. În 6 cazuri rezultatele au fost negative, iar trei nu au putut fi interpretate. Totodată au fost inoculați 30 de hamsteri cu produse patologice, dintre care 18 cazuri au prezentat pozitivitate. 22 de seruri normale recoltate de la indivizi sănătoși au dat rezultate negative.

În ficatul hamsterilor inoculați cu tulpinile RT 110 și RF 303 la microscopul electronic s-au găsit corpusculi de aprox. 15 milimicroni, similari particulelor virotice.



Fig. nr. 1. - Tulpina RT 110. Mărimre: 22.000 x



Fig. nr. 2. - Tulpina RT 303. Mărimre: 40.000 x



Fig. nr. 3. - Tulpina izolată din ser de bolnav.
Mărimre: 46.250 x



Fig. nr. 4. - Tulpina izolată din materii fecale.
Mărimre: 40.000 x





Fig. nr. 5. - Mitochondriu din celulă Detroit-6, infectat cu material hepatitic. Măritime: 26.000 x



Fig. nr. 6. - O parte dintr-o celulă hepatică a unui bolnav. Măritime: 40.000 x



Fig. nr. 7. - O parte dintr-o celulă hepatică a unui hamster, infectat cu tulpina RT 110. Măritime: 60.000 x

Ceea ce pare interesant în experiențele repetate este că în lichidul amniotic-alantoidean al embrionilor de găină infectați cu tulpinile S III și RT 303, am observat ridicarea valorilor titrului de aldolază.

Interpretarea rezultatelor

În baza experiențelor efectuate la institutul nostru și pe baza datelor recente din literatură, se poate afirma că cultivarea virusului h. e. pe culturi embrionare umane, celule Detroit-6 și KB și în unele cazuri chiar și pe celulele embrionilor de găină de 9—11 zile, este posibilă. Păreră noastră este că pentru cultivare, serul fetal bovin este mai eficace, decât serul de vițel. Cultivarea în tuburi rulante este mai favorabilă, decât cea în tuburi staționare.

În opoziție cu observațiile lui Hillis și Bang (11) noi am constatat că celulele embrionare umane de ficat sînt apte pentru izolarea virusului h. e.

Diversitatea sub care se prezintă virusurile cultivate (15—70 milimicroni), descrise și în lucrările noastre anterioare (13) s-ar putea explica prin agregarea particulelor de 15 milimicroni. Acest fenomen se poate observa și pe secțiuni ultrafine făcute din ficatul bolnavilor hepatitici.

Constatăriile noastre sînt sprijinite de observațiile lui Braunsteiner și colab. (6) și ale lui Bearcroft (4); dar și lucrările lui L. Cossel (7, 8) și B. Gueft (10) relatează diferite mărimi de corpusculi elementari.

În lucrarea sa Cossel (8) amintește că o parte a particulelor virotice de 20—240 milimicroni observate de el sînt formate din granule de 9—11 milimicroni. Între particulele mai mari (45—240 milimicroni) unele au forme inelare, care conțin așa-zise granule interne mici. După acest autor se pare că varietatea formei ar fi legată de dezvoltarea ciclică a virusului.

E demn de relevant faptul că L. Boër, bazîndu-se pe cercetări serologice efectuate în anul 1952—53 într-o lucrare publicată acum doi ani (19) sugerează posibilitatea formării particulelor virotice incomplete în cursul dezvoltării virusului h. e. presupunere ce pare a fi confirmată în plăcile lui L. Cossel (8).

Faptul că în urma infectării hamsterilor cu virusurile izolate de noi (RT 110 și RT 303) în ficatul acestor animale se pun în evidență atît corpusculi de 15—30 milimicroni, similari corpusculilor elementari, cît și modificări hepatice cu tendința la ciroză, constituie un indiciu al patogenității tulpinilor față de animale. Această observație este bazată și pe cercetări biochimice efectuate cu ocazia inoculărilor pe embrionii de găină.

Concluzii. Am inoculat seruri și materii fecale, tratate în prealabil timp de 10 minute la 60°C, provenite de la 80 de bolnavi hepatici, pe celule embrionare umane hepatice și renale obținute prin tripsinizare, pe celule Detroit-6 și KB, precum și pe culturi de țesuturi de embrioni de găină. Din 19 suspensii de materii fecale izolarea virusului a reușit după o cultivare de 7—14 zile în 8 cazuri, iar din 61 de seruri în 9 cazuri.

Mărimea corpusculilor din tulpina RT 110 izolată din sînge, și a celor izolați din materii fecale, RT 303 și S III, a fost 15—70 milimicroni. Particulele mari provin din agregarea particulelor de 15 milimicroni. Două tulpini diferă în mărime de cele de mai sus (80—90 de milimicroni și 55—60 de milimicroni).

Prin studiul electronmicroscopic al culturilor celulare infectate, se poate observa alterarea mitocondriilor. În reticulul endoplasmatic apar corpusculi de 70 de milimicroni, corespunzătorii virusurilor.

În trei țesuturi hepatice obținute prin biopsie se pot observa la microscopul electronic particule de 60 de milimicroni, care par a fi formate prin agregarea particulelor mici.

În ficatul hamșterilor inoculați intrahepatic cu tulpinile RT 110 și RT 303, apar uneori modificări histopatologice grave. În ficat se găsesc corpusculi de 15—30 milimicroni, similari particulelor virotice.

Bazîndu-ne pe rezultatele unor cercetări recente și anterioare sîntem de părere că tulpinile izolate de la bolnavii hepatitici au rol în etiologia hepatitei epidemice.
Sosit la redacție : 18 iunie 1962.

Bibliografie:

1. ADERCA I., M. IANCONESCU: comunicare personală; 2. ANANIEV V. A., A. K. SUBLADZE: *Voprosi virusologhii* (1961), 5, 538; 3. ARAKAWA S., MURAOKA T., KANEKO T., SEKI T., GOTO N.: *Jap. Microb.* (1960), 4/m. 371—387; 4. BEARCROFT W.G.C.: *Nature* V. 190 (1961), 4775, 549—550; 5. BRAUNSTEINER H., FELLINGER K., PAKESCH F.: BEYREDER J., GRABNER G., NEUMAYR A.: *Klin. Wochenschr.* (1957), 35, 901; 6. BRAUNSTEINER H., FELLINGER K., PAKESCH F.: *Klin. Wochenschr.* (1962), 4, 210—211; 7. COSSEL L.: *Klin. Wochenschr.* (1959), 37, 743, 1263; 8. COSSEL L.: *Acta Hepato-Splenologica* V. (1961), 8, 6, 333—356; 9. ESSEN K. W., LEMBKE A.: cit. de Siede, W.: *Virushepatitis*. J. A. Barth Verlag, Leipzig (1958); 10. GUEFT B.: *Archiv of Path.* (1961), 72/1. 61—70; 11. HILLIS W. D., F. B. BANG: *Exp. Cell. Res.* (1962), 26, 9—36; 12. LASZIO J.: ABRAHAM S., PETER M., KISS E., DOMOKOS L., MAKAI MARGIT, SZENTKIRALYI EVA, KOVATS F., BALINT E.: *Orvosi Szemle* (1961), 2, 164—166; 13. LASZLO J., PETER M., FILEP GY., ABRAHAM S., BALINT E., PAAL GY., DOMOKOS L., KASZA K., BEDÓ S.: *Orvosi Szemle* (1962), 1, 45—47; 14. MORZYCZKA M., TAYLOR A.: *Bull. Inst. Mar. Med. Gdansk* (1958), 9, 1—2, 37—42; 15. NICOLAU ȘT. S.: *Hepatitele infecțioase infra-microbiene*. Edit. Acad. R.P.R. București (1957); 16. RIGHTSELL W. A., RUTH A., KELTSH A., R. TAYLOR, J. D. BOGGS, WM. MCLEAN J.A.M.A. (1961), v. 177, 10, 671—682; 17. RIGHTSELL W. A. și colab.: *Science* (1956), 124, 226—228; 18. WILD-FUHR G.: *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.* (1953), 110, 147; 19. BOER L., EISIKOVITS K., MAGDÓ J.: *Orvosi Szemle* (1960), 2, 172—175;