

## CERCETĂRI ÎN LEGATURA CU TRANSMITEREA VIRUSULUI HEPATITEI EPIDEMICE LA EMBRIONUL DE GAINA

I. László, M. Péter, V. Filep, I. Lőrincz, A. Ábrahám, Susana Almási, Susana Tinkl, Juliana Both, L. Kasza, I. Csiky

Prima cultivare a virusului hepatitei epidemice (h. e.) pe membrana corio-alantoideană a embrionului de găină (e. g.) a fost relatată în 1941 de către *Siede* și *Meding*. Acești autori, inoculând bilă recoltată de la bolnavi de hepatită, pe membrana corio-alantoideană a embrionului de găină au constatat că moartea embrionilor s-a produs în decurs de 4—5 zile.

Deși embrionii nu au prezentat modificări macroscopice, țesutul lor s-a dovedit a fi infecțios.

Rezultate pozitive similare au fost obținute de *V. Essen* (1) și de *L. Benda*, *F. Gerlach*, *E. Kissel* și *H. Thaler* (21), de *St. S. Nicolau* și colaboratorii (3, 4).

*M. Sanders*, *M. Soret* și *E. Padson* (5) au constatat că tulpinile de virusuri hepatice P. G., M. H. și P. O. R. sînt patogene pentru e. g.

În opoziție cu aceste date, alți cercetători, ca *Findlay*, *Mc. Callum* și *Murphy-troyd* (6) nu consideră că inoculările pe embrioni de găină ar fi corespunzătoare în diagnosticul h. e.

Amintim faptul că unii cercetători, ca *N. Cajal*, *M. Cepleanu*, *M. Copelovici* (7) atribuie rezultatele negative ale inoculărilor cu materiale hepatice pe e. g. variației virusurilor hepatitei. Acest lucru ar fi cauza că virusurile și-au pierdut patogenitatea față de e. g.

În ultimii ani lucrările lui *H. Reploh* și *K. A. Primavesi* (8), *K. A. Primavesi* (9) și *Segagni*, *Ansaldo* și *Nigro* (10, 11, 12) au reactualizat problema utilizării inoculărilor pe e. g. în diagnosticul hepatitei epidemice.

Rezultatelor pozitive anterioare li se adaugă observația lui *O. Malley* și colab. (13) care au dovedit că tulpina de virus A<sub>1</sub> izolată de acești autori se înmulțește în culturile de țesuturi de e. g.

Date noi relatate în literatură — *Rightsell* și colab. (14), *László* și colab. (15, 16, 17), *Mitroiu* și colab. (18), *Ananiev* și *Subladze* (19), *Kerim-Zade* (20) și *Taylor* și colab. (21) arată că virusurile hepatice se pot cultiva în diferite culturi de țesuturi.

Aceste lucrări nu se ocupă însă de problema transmisibilității virusurilor hepatice pe e. g.

Ne-am propus să studiem transmiterea virusurilor hepatice pe e. g. și posibilitatea utilizării ei în scopuri diagnostice.

### Material și metodă

Ouale incubate timp de 9—12 zile au fost infectate cu produse patologice (ser de bolnav, filtrat de materii fecale, lichid c.r., bilă, suc duodenal) recoltate de la bolnavi de hepatită, cu lichidul culturilor de țesuturi infectate și cu tulpinile de virusuri RT 303, S. III. V/6, V/9, V/48 și R, izolate de noi. Tulpina R a fost izolată de la un bolnav confirmat ca hepatită serică. Inoculările s-au făcut pe membrana corio-alantoideană și în sacul amniotic. Tulpinile de virusuri au fost inoculate prin camera de aer a embrionului, în sacul amniotic.

După 4—6 zile de la infectare, embrionii au fost sacrificați, iar ficatul lor examinat prin metode histologice și electronmicroscopice. Din lichidul amniotic-alantoidean

am titrat valorile aldolazei, utilizând metoda lui *Bruns și Puls* (2). Au fost considerate pozitive valorile mai mari de 10 unități, deoarece embrionii de control au prezentat valori pînă la 10 unități. Autorii sovietici *Ananichian și Baroian* (23) în cursul cercetărilor au considerat drept valoare normală 3 unități. Piesele de ficat, pentru examinări electronmicroscopice au fost fixate după metoda *Palade*, apoi incluse în metacrilat de butil și metil și secționare. Am folosit un microscop electronic de masă TESLA BS 242 A.

### Rezultate

#### I. Inocularea embrionilor de găină cu diferite materiale hepatice.

În afara cercetărilor prealabile, am examinat 241 e. g. Rezultatele sînt cuprinse în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1.

Materialul examinat	Pozitiv	Negativ	Neinterpretabil	Total
Ser hepatic	50(53,7%)	32(34,4%)	11(11,9%)	93
Filtrat de materii fecale	20	3	9	32
Culturi de celule infec. cu materiale hepatice	13	7	4	24
Lichid cefalo r. hepatic	3	2	1	6
Alte materiale patologice (bilă, suc duod. etc.)	5	7	8	20
<b>Total</b>	<b>91(37,7%)</b>	<b>51(21%)</b>	<b>33(13,6%)</b>	<b>175</b>
Materiale normale (bilă, mat. fecale)	5(7,5%)	57(86%)	4(6%)	66
<b>Total</b>				<b>241</b>

Am considerat pozitive cazurile în care au dominat alterările țesutului hepatic: infiltrații perivascularare, apariția trombozei canalei biliare, sîngerări în țesutul parenchimos și degenerarea celulelor hepatice: vacuolizarea citoplasmei și degenerarea nucleilor. Nu au fost interpretabile cazurile în care embrionii au sucombat după 24—48 ore de la inoculare. Din tabel rezultă că pozitivitatea totală în cazurile hepatice a fost de 37,7%.

#### II. Determinarea valorii aldolazei în lichidul amniotic-alantoidian al embrionilor de găină inoculați cu materiale hepatice

Pentru a decide dacă virusul se înmulțește în țesuturile embrionului și cauzează modificări hepatice, am studiat schimbările valorii aldolazei în lichidul amniotic-alantoidian, comparîndu-le cu rezultatele histopatologice. Au fost inoculate 35 de materiale hepatice pe membrioni de găină și după 72 de ore, 4 zile și 6 zile de la infectare am dozat titrul aldolazei.

Tabelul nr. 2.

Timpul trecut de la infectarea embrionului	Valoarea aldolazei și numărul cazurilor histopatologice pozitive							
	1—10 U H +	10—20 U H +	20—30 U H +	peste 30 U H +				
72 ore	8	—	5	—	—	—	—	—
4 zile	1	—	9	8	1	1	1	1
6 zile	4	3	2	1	2	1	2	2
H + = rezultate histopatologice pozitive.								

Sintem de părere deci că există o strînsă legătură între modificările patologice și valoarea aldolazei. În sprijinul acestei observații pledează faptul că valoarea titrului de aldolază la embrionii infectați cu o tulpină de virus recent izolată, tulpina S III se modifică astfel: după 72 ore de la infectare, titrul aldolazei este de 13,3 unități, după patru zile de 13,3 unități, iar după 6 zile de 64,25 de unități. Aceste valori au fost găsite în repetate rînduri.

### III. Determinarea valorii aldolazei în lichidul amniotic-alantoidean al embrionilor de găină după infectarea lor prealabilă cu tulpini de virusuri izolate de la bolnavi de hepatită.

Pentru determinarea aldolazei au fost infectați 59 de embrioni de găină cu tulpini de virusuri izolate în Laboratorul de virologie al catedrei noastre.

Rezultatele sînt cuprinse în tabelul următor.

Tabelul nr. 3.

Tulpina de virus	Valoarea aldolazei și numărul cazurilor									
	0—5 U	5—10 U	10—20 U	20—30 U	30—40 U	40—50 U	50—60 U	60 U	Total	
S	1	4	2	—	—	—	—	—	7	
S III	—	—	1	1	1	—	—	1	4	
RT 303	6	—	1	2	—	—	—	—	9	
V/6 (rinichi)	3	2	2	5	—	—	—	2	14	
V/6 (ficat*)	—	—	1	1	1	—	—	—	3	
V/9 (rinichi*)	2	3	3	1	1	—	—	2	11	
R	2	1	1	1	—	1	—	—	6	
V/48	2	1	1	—	—	1	—	—	5	
	16	11	12	10	3	2	—	5	59	
Control	2	9	—	—	—	—	—	—	11	
Total	18	20	12	10	3	2	—	5	70	

\* Cultivat pe celule renale sau hepatice.

Dintre 59 de e.g. infectați cu virusuri, la 27 s-au constatat valori sub 10 unități, iar în 32 de cazuri peste acest titru.

Din lotul valorilor scăzute putem face abstracție de cele 6, pe care le-am obținut cu virusul RT 303, cultivat pe fibroblaști de găină, deoarece acest virus nu se dezvoltă pe celule de găină, ci numai pe celule Detroit-6. Virusul RT 303 cultivat pe celule Detroit 6, după cum rezultă și din tabel dă valori de aldolază între 10—20 de unități.

Valorile ridicate le-am obținut atît cu virusurile V/6,68 și 75 U/ cultivate pe celule renale embrionare umane, cit și cu tulpinile V/9 (80—120 U) și R (17 U) cultivate tot pe celule renale.

Valorile aldolazei sînt cuprinse în graficul anexat (fig. nr. 6).

Cea mai pronunțată sensibilitate față de virusuri se pare că au manifestat-o embrionii de 9 zile, dat fiind că cei mai mulți dintre ei au murit în a treia zi de la inoculare: după vîrsta de 12 zile, receptivitatea a scăzut, însă embrionul a reacționat la infecție, fapt manifestat prin ridicarea valorii de aldolază.

### 2. Cercetări electronmicroscopice.

În cursul determinării valorilor de aldolază, am efectuat și studiul electronmicroscopic al ficatului, acordînd o mare atenție procesului de includere.

Examinările la microscopul electronic au dat rezultate interesante. Celulele hepatice infectate cu tulpina V/9 au prezentat următoarele alterări: vacuolizarea nucleilor, umfla-

rea mitocondriilor, dislocarea structurii interne. În citoplasmă au apărut pe alocuri formațiuni dreptunghiulare, alcătuite din granule așezate în șir. În alte locuri s-au găsit formațiuni granulare și firisoare circumscrise, având un aspect asemănător cu cel al „viroplasmei“ (fig. nr. 1 și 2).

După infectarea celulei hepatice cu o altă tulpină V/72 (fig. nr. 3) în citoplasmă au apărut particule inelare (fig. nr. 4), care nu se găsesc în celulele hepatice normale (fig. nr. 5). Aceste inele sînt alcătuite din granule și seamănă cu corpusculii elementari aglomerați ai tulpinilor R sau V/72.

### Discuții

Din cercetările noastre reiese că după infectarea lor cu materiale recoltate de la bolnavi de hepatită, embrionii de găină reacționează prin modificări morfologice și biochimice. Faptul că între modificările patologice și rezultatele biochimice există o corelație strînsă ne îndreptățește să deducem că e. g. reacționează după infectarea cu materiale hepatice. Confruntarea modificărilor morfologice și biochimice, confirmă justetea sporadicele date din literatura de specialitate, referitoare la această problemă (23).

Cercetările efectuate cu tulpinile de virusuri izolate de la bolnavii de hepatită întăresc presupunerile noastre anterioare, privind receptivitatea embrionului de găină față de virusul hepatitei, deoarece la e. g. infectați cu tulpina S III am pus în evidență ridicarea valorii aldolazei.

În literatura studiată de noi, nu am găsit relații similare.

Examinările făcute la microscopul electronic ne-au dus la unele observații interesante. Pe lângă alterarea întregii celule, am văzut formațiuni speciale, asemănătoare incluziilor, sau chiar viroplasmei. În alte cazuri, am găsit corpusculii inelari, compuși din granule. Apariția acestor elemente ar putea fi pusă în legătură cu infecția virotică, avînd în vedere că în celulele neinfectate nu le-am găsit, putînd fi observate în schimb în celulele hepatice obținute prin biopsia ficatului uman.

Cu toate că țesuturile embrionare umane, și deci și cele de e. g., pot fi aplicate pentru cultivarea virusurilor, totuși acest mediu nu este optim pentru virusurile hepatitei. Țesuturile embrionilor de găină de 9 zile sînt cu mult mai receptive, decît cele de 12 zile sau de 2 săptămîni. Acest fenomen s-ar putea explica prin faptul că procesul de maturare biologică a celulelor reduce din ce în ce posibilitățile pentru absorbția virusurilor.

Sosit la redacție: 2 aprilie 1963.

### Bibliografie

1. ESSEN V.: Deutsches Archiv f. Inn. Med. (1949), 195, 280; 2. BENDA L., GERLACH F., KISSEL L., THALER H.: Deutsches Arch. f. Ges. Virusforsch. (1949), IV, 90; 3. NICOLAU ST. S., CAJAL N., ALBU C., CEPLEANU M.: Studii și Cerc. Infarmacol, Microb., Parazit (1952), 3, 29; NICOLAU ST. S., CAJAL N., CEPLEANU M., ALBU C.: Studii și Cercet. Infarmacol, Microb., Parazit (1953), 4, 207; 5. SANDERS M., SORET M., PADSON E.: Studii și Cerc. Infarmacol. (1960), 3, 481, Ref.; 6. FINDLAY MC. CALLUM, MURGENTROYD: cit. PRIMAVESI K. A.; 7. CAJAL N., CEPLEANU M., COPELOVICI M.: Comunicare prez. la Inst. Infarmacol. al Acad. R.P.R. (1958) V. 27; 8. REPLOH H., PRIMAVESI K. A.: Deutsch. Med. Wochenschr. (1960), 85, 801; 9. PRIMAVESI K. A.: Der Virusnachweis bei der Hepatitis epidemica J. A. Barth Verlag Leipzig (1961); 10. SEGAGNI E., ANSALDI N., NIGRO N.: Minerva Pediatrica (1960), 12, 3; 11. SEGAGNI E., ANSALDI N., NIGRO N.: Ibidem (1960), 12, 303; 12. SEGAGNI E., ANSALDI N., NIGRO N.: ibidem (1960), 12, 379; 13. O'MALLEY J. P., MEYER H. M., SMADEL J. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1961), 108, 200; 14. RIGHTSSELL W. A., RUTH A. KELTSCH, TAYLOR A. R., BOGGS J. D., MCLEAN I. WM.: J. A. M. A. (1961), 177, 671; 15. LASZLO J., PETER M., FILEP V., ABRAHAM S., BALINT E., PAAL GYORGYI, DOMOKOS L., KASZA L., BEDO S.: Revista Medicală (1962), VIII, 47; 16. LASZLO J., PETER M., FILEP V., ABRAHAM S., BALINT E., DOMOKOS L., KASZA L., PAAL GYORGYI, BEDO S.:



Fig. nr. 1.

Fig. nr. 1: Fragment de celulă hepatică la un embrion de găină. Sub acțiunea virusului hepatitei apare o formație dreptunghiulară. Mărire de 17.200 de ori.

Fig. nr. 2: Fragment de celulă hepatică la un embrion de găină. După infectare cu virusul hepatitei, în citoplasmă se observă o leziune asemănătoare „viroplasmelor”. Mărire de 12.000 de ori.

Fig. nr. 3: Virusuri marcate V/72 izolate din materiale hepatitice, manifestând tendința spre aglomerație. Mărire de 15.000 de ori.

Fig. nr. 4: Fragment de celulă hepatică la un embrion de găină. După infectare cu virusul hepatitei, în citoplasmă apar formații inelare. Mărire de 20.000 de ori.

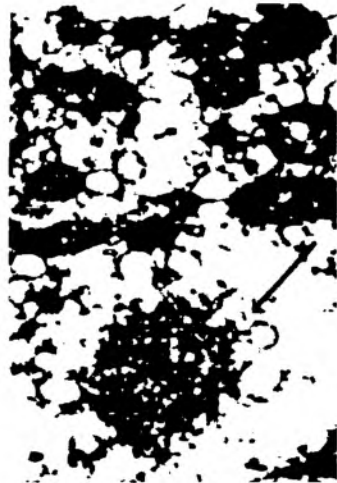


Fig. nr. 2.



Fig. nr. 4.



Fig. nr. 3.

Studii și cerc. inframicrob. (1962), XIII, 313; 17. LASZLO J., PETER M., FILEP V., KASZA L., ALMASI ZSUZSA, JULIANA BOTH, NAGY A.: Revista Medicală (1962), VIII, 321; 18. MITROIU O., BARBU C., CAJAL N., DEMETRESCU R., IONESCU T.: Studii și cerc. inframicrob. (1962), XIII, 319; 19. ANANIEV V. A., SUBLADZE A. K.: Vorprosi virusol. (1962), XIII, 319; 19. ANANIEV V. A., SUBLADZE A. K.: Vorprosi virusol. (1962), 3, 342; 20. KERIM—ZADE K.: Vorprosi virusol. (1962), 5, 582; 21. TAYLOR A. R., RIGHTSELL W. A., BOGGS J. D., McLEAN I. WM.: Amer. Journ. Med. XXXII. (1962), 5, 679; 22. BRUNS F., PULS W.: Klin. Wschr. (1954), 32, 656; 23. ANANIKIAN A. M., BARIOAN O. V.: Vorprosi virusol. (1959), 3, 330.