

INCERCĂRI DE IMUNIZĂRI ACTIVE ÎN HEPATITA EPIDEMICĂ*

I. Studiul proprietăților imunogene ale virusurilor hepatitice, formolizate pe hamsteri

I. László, M. Péter, V. Filep, E. Bálint, A. Abrahám, Susana Almási,
Monica Sabău, Susana Tinkl, Iuliana Both

Posibilitatea de cultivare reușită a virusului hepatitei epidemice ridică desigur o serie de probleme; dintre acestea, prevenirea activă a bolii are o importanță teoretică și practică deosebită.

Atît lucrările noastre cît și cele ale unor autori din străinătate (6, 13, 11, 14, 15, 7, 8) au încercat să contribuie la elucidarea etiologiei hepatitelor. Dat fiind faptul că, în diferite laboratoare de specialitate, au fost izolate tulpini cu caractere variate, părerea autorilor nu este unanimă în privința agentului etiologic al bolii. Din acest motiv, Comisia de experți în problema hepatitei consideră unele din virusurile izolate „candidate” de virusuri hepatitice (3).

Este cunoscut faptul că, în cîteva centre de cercetare din S.U.A. cît și la noi în țară, în cadrul laboratorului nostru, au fost izolate virusuri cu caractere morfologice, biologice și serologice similare, fapt care nu denotă poli-etologia virotică a hepatitelor, ci pledează pentru pluralitatea virusurilor hepatitice.

În literatura de specialitate, există cîteva date în legătură cu imunizările active (1, 2), însă acestea nu se referă la imunizări cu virusul hepatitic cultivat pe linii celulare și inactivat.

Scopul cercetărilor noastre a fost prepararea, prin inactivare cu formol, a unui vaccin din virusuri hepatitice tipizate și studierea apariției anticorpilor specifici în serul hamsterilor vaccinați.

* Lucrare prezentată la ședința U.S.S.M., Filiala Tg.-Mureș la 18 martie 1965.

Material și metodă

A) Tulpinile de virusuri utilizate în experiențe au fost: virusurile hepatitice R, V/9, V/6 și 163 S, izolate între anii 1962—1964 în laboratorul nostru pe celule Detroit-6. Recent, pentru cultivarea virusurilor, am folosit o variantă a liniei Detroit-6, denumită de noi Detroit-6 (VA), (8). Virusurile folosite pentru prepararea vaccinurilor au fost cultivate în flacoane Roux sau Kolle, în mediul semi-sintetic LaYe și M 199 (2:1), fără adaos de ser. În general, plăcile inoculate cu 10 cc de virus diluat $\frac{1}{5}$ au fost incubate timp de 6—30 de zile la 37° C. Multiplicarea virusurilor a fost verificată prin titrarea lor pe celule Detroit-6 (VA) în tuburi așezate în aparat de rotat tuburi, menținute 6—14 zile la 37° C.

B) Pentru încercări de tipizare a tulpinilor de virusuri, înainte de inactivare, s-au efectuat reacții de seroneutralizări și de fixare a complementului, după metodele uzuale.

C) Fiecare tip de virus a fost caracterizat pe baza:

— caracterelor morfologice examinate cu ajutorul microscopului electronic, în suspensii și secțiuni din celule Detroit-6 (VA), incluse în Vestopal W;

— termorezistenței față de temperatura de 60° C și 98° C. În acest scop, suspensiile virotice au fost ținute timp de 30' la temperatura respectivă și inoculate ulterior pe celule sensibile Detroit-6 (VA), efectuând 5 treceri succesive;

— rezistenței față de eter a virusurilor, care, ulterior, au fost trecute pe celule Detroit-6 (VA). Apariția efectului citopatic a fost urmărită în 5 pasagii;

— acumulării ARN-ului virotic, determinat prin aplicarea colorației cu acridin-oranj.

D) Determinarea patogenității virusurilor față de embrionul de găină și animalele de experiență s-a făcut după metodele descrise în lucrările noastre anterioare (7, 8).

E) Inactivarea virusurilor hepatitice prin formol.

Bazându-ne pe caracterele virusurilor izolate de noi, pentru inactivare, am folosit următoarele cantități de formol neutru: 4^o₁₀₀, 1^o₁₀₀, și 0,5^o₁₀₀. Suspensia virotică a fiecărui tip, care conținea DCP₅₀ la dil. 10⁻⁶ a fost centrifugată timp de 30' la 3000 t/min. și trecută prin filtre Jena G 5. Înainte de adăugarea formolului în cantități necesare, am verificat încă odată titrul virusurilor pe celule Detroit-6 (VA) și cu ajutorul microscopului electronic. În lucrarea de față, ne ocupăm numai de vaccinările efectuate cu virusurile inactivate cu formol 1%. După adăugarea formolului, suspensiile virotice din fiecare tip au fost menținute timp de 2 ore la 54° C și 10 zile la 37° C, iar, până la folosirea lor, la + 4° C. Înainte de vaccinare, virusurile inactivate au fost controlate, pentru a stabili dacă în suspensie au rămas particule infectante sau nu.

F) Pentru a controla inactivarea virusurilor din fiecare vaccin, am efectuat inoculări pe:

— ou embrionat (pentru determinarea toxicității),

— culturi de celule Detroit-6 (VA).

Virusurile inactivate au fost inoculate în cavitatea amniotică a embrionilor în cantitate de 0,1 cc. Embrionii au fost examinați zilnic la ovescop. Aceste examini au fost repetate de trei ori, pentru a evita orice eroare în interpretarea rezultatelor. Înainte de ecloziune, embrionii au fost sacrificați prin înghețare, iar ficatul lor a fost examinat microscopic.

În partea a doua a controlului inactivării virusurilor, vaccinurile au fost trecute pe celule Detroit-6 (VA) și incubate la 37° C în aparat de rotat tuburi. Din 6 în 6 zile, am efectuat treceri pe noi culturi (în total 5), cu scopul de a surprinde o eventuală reactivare sau apariție a particulelor virotice neinactivate.

G) Metoda imunizărilor.

Deoarece până în prezent — cu excepția omului — nu s-a stabilit dacă există vreo specie de mamifer, care ar reproduce boala tipică, am recurs la folosirea hamsterilor. Aceștia, cu toate că manifestă o sensibilitate redusă față de virusul

hepatitei, totuși reacționează la acțiunea acestuia prin modificări histopatologice apreciable.

Unele publicații în legătură cu sensibilitatea cimpanzeilor la virusul hepatitei (5, 4) arată că animalele din această specie cu toate că uneori pot fi purtători de virus hepatitic, dau rar forma tipică a bolii. Deci nici această specie de mamifer nu prezintă o receptivitate generală față de virusul hepatitei.

Pentru imunizări, am folosit 50 de hamsteri de 95—135 gr, dintre care 30 au fost imunizați cu virusuri inactivate cu formol 1%, iar 20 cu virusuri inactivate cu formol 0,5%. Animalele au primit de 3 ori 0,4 cc vaccin-virus în felul următor: 0,4 ml intramuscular; după 2 zile 0,4 cc subcutanat și după 1 săptămână 0,4 cc subcutanat.

Animalele dintr-un alt lot au fost inoculate cu virusuri active, administrind de 2 ori, 0,5 cc, respectiv 1,0 cc virus intraperitoneal.

După 4, respectiv 8 săptămâni de la vaccinare, animalele au fost sacrificate, iar eficacitatea vaccinărilor a fost studiată prin:

- determinarea anticorpilor neutralizanți față de virusul viu omolog;
 - determinarea anticorpilor fixatori de complement față de virusul viu omolog și în parte față de virusul eterolog;
 - încercarea reisolării virusurilor de la animalele inoculate cu virus și controlul eliminării virusurilor la cei vaccinați. (Controlul eliminării virusurilor s-a făcut pe celule Detroit-6 (VA) în 5 treceri succesive.)
 - controlarea modificărilor ficatului și a prezenței virusurilor după vaccinare, respectiv la martori după infectări, s-a făcut parțial cu microscopul electronic;
 - efectuarea examinărilor histopatologice din ficat.
- 1) Evaluarea vaccinărilor cu virusuri formolizate s-a făcut pe baza răspunsului imunologic, care a fost comparat cu rezultatele obținute din materialul nostru în cazuri umane.

Rezultate

A) Virusurile utilizate în cercetările noastre și cultivate pe celule Detroit-6 (VA) sînt virusuri cu dimensiuni de 15 milimicroni, care, după o cultivare de 4—14—20 zile, formează agregate în formă de rozetă. Fenomenul de reproducere a virusurilor a fost descris într-o lucrare anterioară (8). Virusurile hepatitelor se caracterizează prin faptul că nu atacă toată populația culturilor de celule, ci numai pe cele sensibile, deci provoacă un efect citopatic cu retractarea celulelor, în focare, cauzînd apariția unor ciorchini de celule. În ultrasecțiunile electuate din aceste celule, se pot observa modificări nucleare cu apariția unor corpusculi denși. Domină însă alterarea citoplasmei cu dezintegrarea reticulului endoplasmatic. Adesea, mitocondriile se umflă, structura lor internă dispăre, iar pe alocuri pot apărea formațiuni similare incluziilor, cu acumularea de particule cu mărime de 15 milimicroni, sau acestea din urmă formează particule complexe mai mari prin agregare de 4—6 particule sferice — care se așează simetric, în șir (9). Formațiuni similare pot fi găsite și în ficatul indivizilor hepatitici.

B) Tulpinile de virusuri R, V/6, V/9, 163 S au fost folosite la reacția de fixare a complementului (RFC) pentru tipizarea lor, și totodată s-au efectuat și seroneutralizări în scopul amintit. Rezultatele noastre sînt redată în tabelele nr. I, II, III și IV.

Tabela I cuprinde rezultatul reacției de fixare a complementului (RFC) cu serul bolnavilor provenit din primele 2 săptămâni ale bolii. Titrurile obținute ne arată că cele 4 virusuri au fracțiuni antigenice — fixatoare de complement — comune și că se constată o creștere a anticorpilor fixatori de complement în 3 cazuri.

Tabela II ilustrează titrul anticorpilor fixatori de complement în convalescență și în hepatită cronică. Din aceste date reiese că, în convalescență, titrul

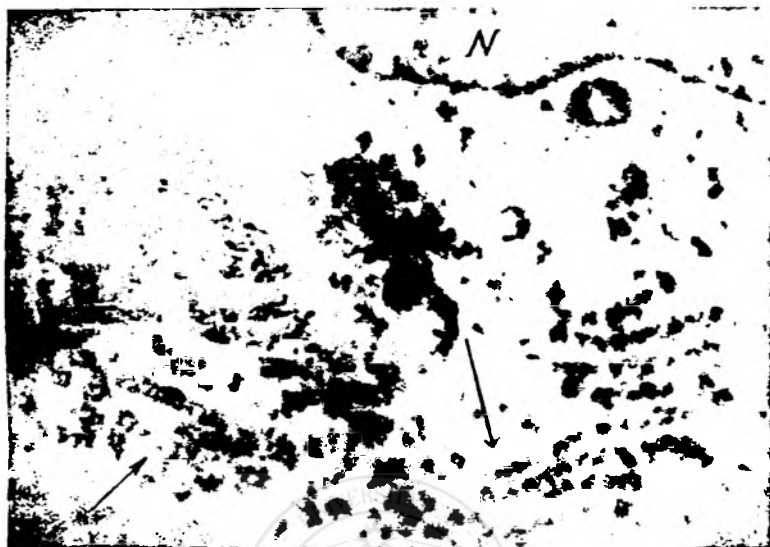


Fig. nr. 1.: Virusul 163 S, cultivat pe celule D₈ (VA). Așezarea în șiruri simetrice a particulelor elementare. Mărire 30.000 X.

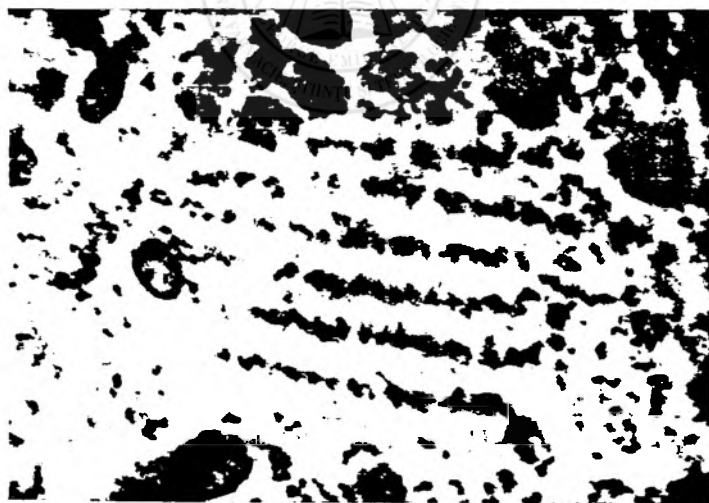


Fig. nr. 2.: Virusul 163 S. Așezarea în șiruri simetrice a particulelor elementare. Mărire 35.000 X.



Fig. nr. 3.: Ficat de hamster după 2 luni de la inoculare cu vaccinul R formalizat. Citoplasmă fără alterări. Mărire: 17.200 X.

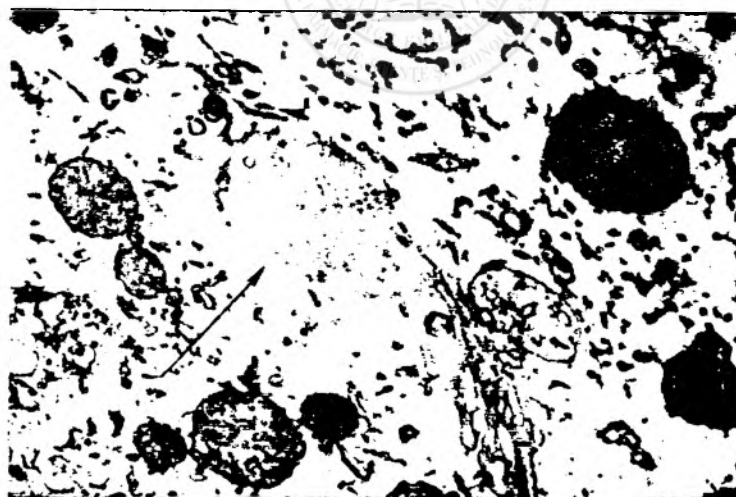


Fig. nr. 4.: Așezarea în formă de incluziune a particulelor cu aspect de rozetă în citoplasma celulei hepatice a unui hamster, infectat cu virusul viu V/9. Mărire: 17.200 X.

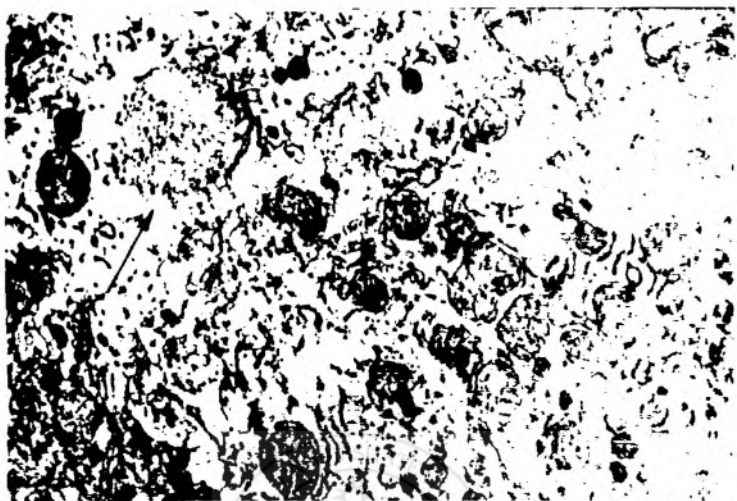


Fig. nr. 5.: Incluziune cu particule virotice în ficatul hamsterului, după 30 de zile de la infectare cu virusului viu V 6. Mărire: 12.000

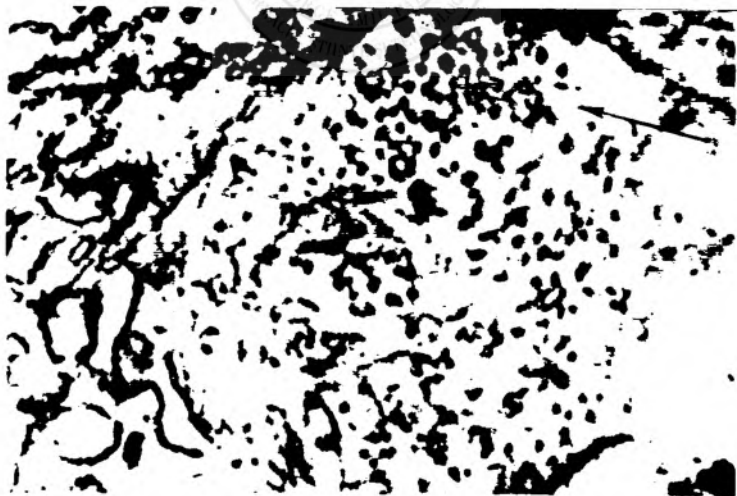


Fig. nr. 6.: Particule virotice cu aspect de rozetă și corpusculi mici denși, în ficatul hamsterului, după 30 de zile de la inoculare cu virusul viu, tulpina R. Mărire: 35.000X.

anticorpilor fixatori de complement scade și nu atinge valori pozitive peste $1/64$. În hepatita cronică, acest titru este și mai scăzut. De la 5 donatori de sînge în două cazuri am obținut titru pozitiv de $1/2$ față de virusurile utilizate în RFC.

Tabelul III arată acțiunea neutralizantă a serurilor unor bolnavi hepatitici. Din 8 seruri, s-a examinat numai în 2 cazuri, în detaliu, titrul anticorpilor neutralizanți, iar în celelalte cazuri, s-au făcut diluții numai pînă la $1/5$, avînd în vedere că scopul principal în această serie a fost tipizarea tulpinilor. Rezultatul neutralizării ne dovedește că între tulpinile izolate există înrudire serologică.

Tabelul IV confirmă cele observate în tabelele anterioare deci existența fracțiunilor antigenice comune pentru cele 4 tulpini de virusuri izolate de noi.

C) Caracterizarea virusurilor hepatitice.

— Morfologia virusurilor izolate este identică, lucru confirmat prin faptul că după purificarea lichidului culturilor de celule infectate s-au găsit particule sferice de 15 milimicroni cu tendință de agregare. În majoritatea cazurilor, 4—6 particule se agregă, luînd aspect de rozetă.

— Virusurile R, V/6, V/9 și 163 S prezintă o rezistență marcată față de temperaturi ridicate: astfel, o temperatură de 60° — 65° C nu modifică nici după 30' proprietatea citopatică a virusurilor. Virusurile R și 163 S nu sînt omorite după $30'$ nici la 98° C.

— Tulpinile noastre sînt rezistente la eter, fapt verificat prin trecerea lor pe celule Detroit-6 (VA), efectuînd 5 pasagii succesive.

— După cum reiese din colorația acridin-oranj, virusurile cauzează acumularea de ARN în citoplasma celulelor infectate. În secțiuni ultrafine această acumulare ar corespunde apariției unor „incluzii” cu substanță granulară (viroplasmă) sau a unor incluzii cu particule virotice în formă de rozetă.

D) Determinarea patogenității virusurilor față de embrionul de găină a fost studiată de noi într-o lucrare anterioară (7). Din concluziile acestei lucrări, reiese că virusurile hepatitelor umane pot cauza modificări histopatologice și biochimice în embrionii de găină, cu apariția virusurilor, însă receptivitatea embrionilor de găină față de virusul hepatitei scade în raport cu vîrsta embrionilor.

Transmiterea virusului hepatitei umane la diferite specii de animale a arătat că numai în ficatul hamsterilor apar alterări histopatologice similare cu cele din hepatita umană. Pentru stabilirea receptivității, s-au folosit 190 de hamsteri. Valorile transaminazei serice, după 6—12 săptămîni de la infectare, au prezentat modificări ușoare, în funcție de tulpina utilizată. Încă din anul 1962, am observat în ficatul hamsterilor (în două cazuri) apariția unor particule dense cu dimensiunea de 15—30 milimicroni.

E—F) Rezultatele inactivării virusurilor prin formol au fost urmărite prin trecerea suspensiei virotice formulate pe celule Detroit 6 (VA) sau prin inoculare pe oul embrionat. Rezultatele acestor analize sînt cuprinse în **tabelele V și VI**. Inocularea pe celule receptive a virusurilor tratate cu formol arată că formolul inactivează virusurile; nici în pasajul IV nu am constatat apariția efectului citopatic. Totodată virusurile își pierd patogenitatea lor față de oul embrionat.

G—1) Rezultatele vaccinărilor

Rezultatele vaccinărilor, adică răspunsurile imunologice ale hamsterilor imunizați, sînt cuprinse în **tabelele VII și VIII**.

Observațiile noastre în legătură cu imunizările sînt următoarele.

1. După 1 lună de la imunizare cu *virusul viu*, titrul anticorpilor fixatori de complement oscilează între $1/32$ pînă la $1/64$.

2. După 1 lună de la imunizare cu *virusul formolizat* cu 1% formol, titrul anticorpilor fixatori de complement variază între $1/32$ — $1/512$.

3. După 1 lună de la infectare, titrul anticorpilor neutralizanți față de virusul viu omolog este de $1/10$ — $1/40$, iar după vaccinare cu virusul formolizat variază de la $1/10$ pînă la $1/100$.

4. După 2 luni de la infectarea hamsterilor cu virusul viu, RFC arată valori pozitive între $1/64$ — $1/512$, iar după administrarea virusului formolizat între $1/32$ — $1/512$.

5. După 2 luni de la inoculare cu virus viu, titrul anticorpilor neutralizanti este de $1/100$, iar după vaccinare cu virus inactivat, de $1/20$ — $1/100$.

6. După 1 lună de la infectare, virusurile neformolizate au putut fi reizolate din materiile fecale ale hamsterilor (virusurile R, V/6, V/9 și 163 S), iar după 2 luni numai tulpinile R și V/9.

7. După administrarea virusurilor formolizate nu am reușit să reizolăm virusurile din materiile fecale ale hamsterilor.

8. Reizolarea virusurilor a fost confirmată electronoptic, după examinarea celulelor Detroit-6 (VA).

9. În ficatul hamsterilor infectați cu virus viu, am putut pune în evidență, cu ajutorul microscopului electronic, corpusculi așezați în formă de rozetă, similari cu particulele virotice izolate din cazuri umane sau cu cele descrise în ficatul bolnavilor de hepatită. În nici un caz nu am putut observa prezența acestor particule în ficatul hamsterilor, care au fost vaccinați cu virusul formolizat.

10. Examenul histopatologic al ficatului hamsterilor inoculați cu virusul viu arată alterarea gravă a parenchimului hepatic. Virusul inactivat prin formol, cu toate că produce modificări ușoare în ficat (anisocarie, colorația inegală a celulelor hepatice etc.), nu cauzează modificări tisulare atât de profunde ca virusul viu neinactivat.

11. *Tabelul VIII* cuprinde valorile RFC-ului la un număr de 20 de animale vaccinate cu virusuri tratate cu formol de 0,5%; după 3 săptămâni, animalele au fost infectate cu virusul viu omolog, constatându-se o creștere a anticorpilor fixator de complement. Observarea acestui lot de animale continuă.

12. Din comparația răspunsului imunologic obținut de la bolnavii cu hepatită față de virusurile izolate de noi și cele descrise în experiențele de model pe hamsteri, reiese că *organismul uman și animal răspund într-o oarecare măsură în mod analog față de infecția cu virusurile hepatitelor infecțioase.*

13. Din cercetările de față, cât și din cele efectuate între anii 1957—196 rezultă o serie de date, pe baza cărora, virusurile folosite în încercările noastre de imunizare pot fi considerate din următoarele motive drept agenți patogeni hepatitelor:

— Virusurile izolate din serul și mat. fecale ale bolnavilor se aseamănă pr dimensiuni și morfologie cu cele din materialul obținut prin biopsie de la bolna de hepatită.

— Tulpinile izolate de noi in vitro își păstrează patogenitatea pentru om fiind patogene după 2 ani de la izolare: ele au putut fi reizolate din îmbolnăv accidentale de laborator. Boala a avut un decurs tipic, iar anticorpii din ser neutralizat virusul omolog în diluții relativ mari (8).

— Cu ocazia multiplicării virusurilor pe celule Detroit-6 (VA), acestea prezintă o tendință de agregare, dispunându-se sub formă de rozetă sau în șiruri simetrice. Formațiuni identice au fost descrise în ficatul bolnavilor de hepatită în culturi de celule infectate cu serul bolnavilor și de alți autori (13).

— Răspunsul imunologic al hamsterilor față de aceste virusuri corespunde reactivității imunologice a bolnavilor de hepatită.

14. *În general aceste încercări de imunizare confirmă presupunerea noastră conform căreia în hepatită, răspunsul imunologic după boală este variabil, uneori relativ slab, fapt care pledează pentru apariția formelor cronice, recidivante, care persistența virusurilor este un fenomen foarte frecvent.*

Discutarea rezultatelor

Cercetările cu privire la transmiterea virusurilor hepatitelor epidemice cite o serie de animale, însă, în afara unor maimuțe antropoide, specia relativ rec

Tabelul I

Reacția de fixare a complementului efectuată cu serul bolnavilor de hepatită, recoltat în primele 2 săptămâni ale bolii

Nr. crt.	Numele bolnavului	Titru anticorpilor fixatori de complement cu virusurile							
		R		V/9		V/6		163 S	
		I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
		săpt.		săpt.		săpt.		săpt.	
1	H. J.	1/64	1/64	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/32
2	N. J.	neg.	neg.	neg.	1/2	neg.	neg.	neg.	neg.
3	K. I.	1/64	1/128	1/128	1/128	1/64	1/128	1/128	1/4
4	N. E.	neg.	1/128	1/128	1/128	neg.	1/64	1/128	1/128
5	B. G.	1/8	1/128	1/16	1/128	1/4	1/128	1/16	1/8

Tabelul II

Rezultatul reacției de fixare a complementului, efectuată cu serul bolnavilor de hepatită cronică, cu serul bolnavilor convalescenți și cu serul indivizilor sănătoși

Nr. crt.	Numele bolnavului	Titru anticorpilor fixatori de complement, efectuat cu virusurile				
		R	V/9	V/6	163 S	
1	K. J.	1/4	1/2	1/2	1/2	convalescent
2	K. I.	1/4	1/4	1/8	1/8	"
3	N. T.	1/4	1/4	1/8	1/4	"
4	M. A.	1/4	1/2	1/4	1/4	"
5	T. J.	1/4	1/2	1/4	1/8	"
6	N. S.	1/4	1/2	1/16	1/4	"
7	I. V.	neg.	neg.	1/4	1/2	"
8	G. F.	1/2	1/2	1/2	1/4	"
9	M. M.	1/4	1/2	neg.	1/4	"
10	M. J.	1/4	1/16	1/8	neg.	"
11	B. A.	1/8	1/4	1/8	neg.	"
12	F. J.	1/2	1/4	neg.	neg.	"
13	K. A.	neg.	1/2	neg.	neg.	"
14	Sz. J.	1/2	1/2	neg.	1/2	"
15	S. M.	1/8	1/4	1/8	neg.	"
1	T Gy.	1/2	neg.	neg.	neg.	hepatită cr.
2	B G.	1/2	neg.	neg.	1/2	"
3	F. R.	1/2	1/2	neg.	neg.	"
4	Cs. E.	1/4	1/4	1/4	1/4	"
5	C. A.	1/8	1/64	1/8	1/16	"
6	A. P.	1/4	1/8	1/4	1/8	"
7	U. I.	1/4	1/10	1/8	1/8	"
8	B. I.	1/2	1/4	neg.	1/4	"
9	R. A.	1/16	1/16	1/4	1/64	"
10	M. M.	1/8	1/8	1/4	1/4	"
11	M. V.	1/4	1/2	1/2	1/2	"
12	K. E.	neg.	neg.	neg.	neg.	"
13	nr. de ser	164	1/2	1/4	neg.	"
14	"	165	1/2	—	—	"
15	"	166	1/4	1/2	—	"
16	"	168	1/4	1/4	1/2	"
17	"	1	1/2	1/4	1/4	"
18	"	2	neg.	neg.	neg.	set normal
19	"	3	1/2	1/2	neg.	neg.
20	"	4	neg.	neg.	neg.	neg.
21	"	5	neg.	1/2	neg.	neg.

4. După 2 luni de la infectarea hamsterilor cu virusul viu, RFC arată valori pozitive între $1/64$ — $1/512$, iar după administrarea virusului formolizat între $1/32$ — $1/512$.

5. După 2 luni de la inoculare cu virus viu, titrul anticorpilor neutralizanti este de $1/100$, iar după vaccinare cu virus inactivat, de $1/20$ — $1/100$.

6. După 1 lună de la infectare, virusurile neformolizate au putut fi reizolate din materiile fecale ale hamsterilor (virusurile R, V/6, V/9 și 163 S), iar după 2 luni numai tulpinile R și V/9.

7. După administrarea virusurilor formolizate nu am reușit să reizolăm virusurile din materiile fecale ale hamsterilor.

8. Reizolarea virusurilor a fost confirmată electronoptic, după examinarea celulelor Detroit-6 (VA).

9. În ficatul hamsterilor infectați cu virus viu, am putut pune în evidență, cu ajutorul microscopului electronic, corpusculi așezați în formă de rozetă, similari cu particulele virotice izolate din cazuri umane sau cu cele descrise în ficatul bolnavilor de hepatită. În nici un caz nu am putut observa prezența acestor particule în ficatul hamsterilor, care au fost vaccinați cu virusul formolizat.

10. Examenul histopatologic al ficatului hamsterilor inoculați cu virusul viu arată alterarea gravă a parenchimului hepatic. Virusul inactivat prin formol, cu toate că produce modificări ușoare în ficat (anisocarie, colorația inegală a celulelor hepatice etc.), nu cauzează modificări tisulare atât de profunde ca virusul viu neinactivat.

11. *Tabloul VIII* cuprinde valorile RFC-ului la un număr de 20 de animale vaccinate cu virusuri tratate cu formol de $0,5\%$; după 3 săptămâni, animalele au fost infectate cu virusul viu omolog, constatându-se o creștere a anticorpilor fixatori de complement. Observarea acestui lot de animale continuă.

12. Din comparația răspunsului imunologic obținut de la bolnavii cu hepatită față de virusurile izolate de noi și cele descrise în experiențele de model pe hamsteri, reiese că *organismul uman și animal răspund într-o oarecare măsură în mod analog față de infecția cu virusurile hepatitelor infecțioase*.

13. Din cercetările de față, cit și din cele efectuate între anii 1957—1964, rezultă o serie de date, pe baza cărora, virusurile folosite în încercările noastre de imunizare pot fi considerate din următoarele motive drept agenți patogeni ai hepatitelor:

— Virusurile izolate din serul și mat. fecale ale bolnavilor se aseamănă prin dimensiuni și morfologie cu cele din materialul obținut prin biopsie de la bolnavi de hepatită.

— Tulpinile izolate de noi in vitro își păstrează patogenitatea pentru om, fiind patogene după 2 ani de la izolare: ele au putut fi reizolate din îmbolnăviri accidentale de laborator. Boala a avut un decurs tipic, iar anticorpii din ser au neutralizat virusul omolog în diluții relativ mari (8).

— Cu ocazia multiplicării virusurilor pe celule Detroit-6 (VA), acestea prezintă o tendință de agregare, dispunându-se sub formă de rozetă sau în șiruri simetrice. Formațiuni identice au fost descrise în ficatul bolnavilor de hepatită și în culturi de celule infectate cu serul bolnavilor și de alți autori (13).

— Răspunsul imunologic al hamsterilor față de aceste virusuri corespunde reactivității imunologice a bolnavilor de hepatită.

14. *În general aceste încercări de imunizare confirmă presupunerea noastră, conform căreia în hepatită, răspunsul imunologic după boală este variabil, uneori relativ slab, fapt care pledează pentru apariția formelor cronice, recidivante, în care persistența virusurilor este un fenomen foarte frecvent.*

Discutarea rezultatelor

Cercetările cu privire la transmiterea virusurilor hepatitelor epidemice citează o serie de animale, însă, în afara unor maimuțe antropoide, specia relativ recep-

Tabelul I

Reacția de fixare a complementului efectuată cu serul bolnavilor de hepatită, recoltat în primele 2 săptămâni ale bolii

Nr. crt.	Numele bolnavului	Titrul anticorpilor fixatori de complement cu virusurile							
		R		V/9		V/6		163 S	
		I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
		săpt.		săpt.		săpt.		săpt.	
1	H. J.	1/64	1/64	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/32
2	N. J.	neg.	neg.	neg.	1/2	neg.	neg.	neg.	neg.
3	K. I.	1/64	1/128	1/128	1/128	1/64	1/128	1/128	1/4
4	N. E.	neg.	1/128	1/128	1/128	neg.	1/64	1/128	1/128
5	B. G.	1/8	1/128	1/16	1/128	1/4	1/128	1/16	1/8

Tabelul II

Rezultatul reacției de fixare a complementului, efectuată cu serul bolnavilor de hepatită cronică, cu serul bolnavilor convalescenți și cu serul indivizilor sănătoși

Nr. crt.	Numele bolnavului	Titrul anticorpilor fixatori de complement, efectuat cu virusurile					
		R	V/9	V/6	163 S		
1	K. J.	1/4	1/2	1/2	1/2	convalescent	
2	K. I.	1/4	1/4	1/8	1/3		
3	N. T.	1/4	1/4	1/8	1/4		
4	M. A.	1/4	1/2	1/4	1/4		
5	T. J.	1/4	1/2	1/4	1/8		
6	N. S.	1/4	1/2	1/16	1/4		
7	I. V.	neg.	neg.	1/4	1/2		
8	G. F.	1/2	1/2	1/2	1/4		
9	M. M.	1/4	1/2	neg.	1/4		
10	M. J.	1/4	1/16	1/3	neg.		
11	B. A.	1/8	1/4	1/3	neg.		
12	F. J.	1/2	1/4	neg.	neg.		
13	K. A.	neg.	1/2	neg.	neg.		
14	Sz. J.	1/2	1/2	neg.	1/2		
15	S. M.	1/8	1/4	1/8	neg.		
1	T. Gy.	1/2	neg.	neg.	neg.	hepatită cr.	
2	B. G.	1/2	neg.	neg.	1/2		
3	F. R.	1/2	1/2	neg.	neg.		
4	Cs. E.	1/4	1/4	1/4	1/4		
5	C. A.	1/8	1/64	1/8	1/16		
6	A. P.	1/4	1/8	1/4	1/8		
7	U. I.	1/4	1/10	1/8	1/8		
8	B. I.	1/2	1/4	neg.	1/4		
9	R. A.	1/16	1/16	1/4	1/64		
10	M. M.	1/8	1/8	1/4	1/4		
11	M. V.	1/4	1/2	1/2	1/2		
12	K. E.	neg.	neg.	neg.	neg.		
13	nr. de ser 164	1/2	1/2	1/4	neg.		
14	" " 165	1/4	1/2	—	—		
15	" " 166	1/4	1/4	1/2	1/2		
16	" " 168	1/2	1/4	1/2	1/4		
17	" " 1	neg.	neg.	neg.	neg.		set normal
18	" " 2	1/2	neg.	neg.	neg.		
19	" " 3	neg.	neg.	neg.	neg.		
20	" " 4	neg.	neg.	neg.	neg.		
21	" " 5	neg.	1/2	neg.	neg.		

Tabelul III
Seroneutralizări pentru tipizarea virusurilor hepatitice

Nr. crt.	Serul de convalescent	Titrul anticorpilor neutralizanti față de virusurile							
		R	V/9	V/6	163 S	R	V/9	V/6	163 S
1	K. J. nr. de ser 3	$1/5$	$1/5$	$1/5$?				
2	K. I. " " 5	neg.	$1/5$	neg.	$1/5$				
3	M. R. " " 6	$1/5$	$1/5$	$1/5$	$1/5$				
4	N. T. " " 11	$1/5$	$1/5$	$1/5$	$1/5$	$1/120$	$1/120$	$1/10$	$1/5$
5	M. A. " " 12	$1/5$	$1/5$	$1/5$	$1/5$	$1/5$	$1/120$	$1/10$	$1/5$
6	T. J. " " 13	$1/5$	$1/5$	$1/5$	neg.				
7	K. S. " " 14	$1/5$	$1/5$	$1/5$	neg.				
8	I. V. " " 16	$1/5$	$1/5$	neg.	neg.				

Tabelul IV
Seroneutralizări pentru tipizarea virusurilor hepatitice

Nr. crt.	Serul de convalescent	Titrul anticorpilor neutralizanti față de virusurile							
		R	V/9	V/6	163 S	R	V/9	V/6	163 S
1	A.S. nr. de ser —	$1/640$	—	—	—	$1/640$	—	—	$1/640$
2	" " 93	neg.	—	neg.	—				
3	" " 118	$1/80$	—	$1/10$	—				
4	" " 125	neg.	—	$1/80$	—				
5	" " 119	$1/160$	—	neg.	—				
6	" " 121	neg.	—	$1/160$	—				
7	Ser anti-polio	neg.	—	neg.	—				
8	Ser anti-Coxs.	neg.	—	neg.	—				
9	A.S. nr. de ser 160	$1/10$	$1/10$	neg.	neg.				
10	" " 69	neg.	$1/10$	neg.	neg.				
11	" " 93	neg.	neg.	$1/10$	neg.				
12	" " 167	neg.	neg.	$1/10$	neg.				
13	H. J.	$1/20$	$1/40$	$1/20$	$1/20$				

Nr. crt.	Denumirea serurilor	Titrul anticorpilor neutralizanti față de virusurile	
		166	168
1	Nr. de ser 12	$1/40$	$1/80$
2	" " 13	neg.	$1/10$
3	" " 17	$1/10$	neg.
4	" " 5	$1/10$	$1/10$

Tabelul V

Controlul inactivării virusurilor prin formol pe celule D₆ (VA)

Nr. crt.	Material	Pas. I. 3 XII. 1964	Pas. II. 5 XII. 1964	Pas. III. 11. XII. 1964	Pas. IV. 21. XII. 1964
1	R. F. 0,05%	0 — ±	0	0	0
2	R. F. 0,1 %	0 — ±	0	0	0
3	R. F. 0,4 %	0	0	?	0
4	V ₉ . F. 0,05%	0	0	0	0
5	V ₉ . F. 0,1 %	0 — ±	0	±	0
6	V ₉ . F. 0,4 %	0	0	0	0
7	V ₆ . F. 0,05%	0	?	0	0
8	V ₆ . F. 0,1 %	0 — ±	0	? — 0	0
9	V ₆ . F. 0,4 %	0	0	0	0
10	163.F. 0,05%	0	0	0	0
11	163.F. 0,1 %	0 — ±	0	0	0
12	163.F. 0,4 %	0	0	0	0

Observații:

F. 0,05%—0,4% reprezintă cantitățile de formol utilizate pentru inactivarea virusurilor.

± = modificări nespecifice

? = dubios

Tabelul VI

Controlul inactivării virusurilor prin formol pe oul embrionat

Nr. crt.	Material	Exp. I. 1 săpt. după inactivare	Exp. II. 2 săpt. după inactivare	Exp. III. 4 săpt. după inactivare
1	RV Formol 1%	neg.	—	neg.
2	RV " "	neg.	—	neg.
3	163 " "	+	—	neg.
4	163 " "	neg.	—	neg.
5	RV Formol 0,5%	—	±	neg.
6	RV " "	—	±	neg.
7	163 v " "	—	N.A.	neg.
8	163 v " "	—	±	neg.
9	V ₉ v " "	—	±	—
10	V ₉ v " "	—	±	—
11	V ₉ v " "	—	neg.	—
12	V ₆ v " "	—	neg.	—
13	V ₆ v " "	—	neg.	—
14	V ₆ v " "	—	neg.	—

Observații:

± = alterări ușoare ale tegumentului (inflamație) din cauza slabei dezvoltări a embrionilor.

+ = sucombă după 48 de ore de la inoculare

N.A. = nu este apreciabil

Tabelul VII

Rezultatele vaccinărilor exprimate prin răspunsul imunologic al hamsterilor

Nr. crt.	Virusul cu care s-a imunizat		Antigen in RfC	Titru	Titrul anticorpilor neutralizanti*	Reizolarea virusului	Examenul electronopic (ficat hamster)
1	R	Seria I.	R	$1/32$	$1/10$	pozitiv	pozitiv
2	R	Seria II.	R	$1/512$	$1/40$	pozitiv	pozitiv
3	V/9	Seria I.	V/9	$1/64$	$1/10$	pozitiv	pozitiv
4	V/9	Seria II.	163	$1/64$	$1/100(V:9)$	pozitiv	pozitiv
5	V/6	Seria I.	—	—	—	—	—
6	V/6	Seria II.	V/6	$1/32$	$1/10$	dubios	pozitiv
7	163 S	Seria I.	163	$1/32$	$1/40$	±	pozitiv
8	163 S	Seria II.	V/9	$1/4$	—	—	—
			163	$1/128$	$1/100$	±	pozitiv
			V/6	$1/64$	—	—	—
9	R form. 1^{0}_{100}	Seria I.	R	$1/64$	$1/10$	negativ	negativ
10	R form. 1^{0}_{10}	Seria II.	R	$1/512$	$1/100$	—	—
			V/6	$1/512$	$1/100$	negativ	negativ
11	R form. 1^{0}_{100}	Seria II.	R	$1/512$	$1/100$	negativ	negativ
			V/6	$1/512$	—	—	—
12	V/9 form. 1^{0}_{100}	Seria I.	V/9	$1/32$	$1/20$	negativ	negativ
13	V/9 form. 1^{0}_{100}	Seria II.	V/6	$1/32$	—	—	—
			163	$1/512$	$1/100(V:9)$	negativ	negativ
14	V/9 form. 1^{0}_{100}	Seria II.	V/9	$1/32$	$1/10$	negativ	negativ
15	V/6 form. 1^{0}_{100}	Seria I.	V/6	$1/128$	$1/20$	negativ	negativ
16	V/6 form. 1^{0}_{100}	Seria II.	V/6	$1/512$	$1/20$	—	—
			R	$1/512$	—	—	—
17	V/6 form. 1^{0}_{100}	Seria II.	V/6	$1/512$	$1/20$	—	—
			163	$1/128$	—	—	—
18	M $0,4^{0}_{10}$ f.	Seria I.	R	neg.	neg.	negativ	negativ
			163	neg.	neg.	negativ	negativ
19	M $0,4^{0}_{10}$ f.	Seria I.	R	neg.	—	—	—
			163	neg.	neg.	negativ	negativ
20	M $0,1^{0}_{10}$ f.	Seria I.	R	$1/16$	—	—	—
			163	neg.	neg.	negativ	negativ
21	M $0,1^{0}_{10}$ f.	Seria I.	R	neg.	—	—	—
			163	neg.	neg.	negativ	negativ
22	M $0,05^{0}_{10}$ f.	Seria I.	R	$1/8$	—	—	—
			163	$1/8$	neg.	negativ	negativ
23	M $0,05^{0}_{10}$ f.	Seria II.	R	neg.	—	—	—
			V/9	neg.	—	—	—
			V/6	neg.	—	—	—
24	163 form. 1^{0}_{100}	Seria I/a	R	$1/64$	—	—	—
			163	$1/64$	—	—	—
25	163 form. 1^{0}_{100}	Seria I/a	R	$1/32$	—	—	—
			163	$1/32$	—	—	—
26	163 form. 1^{0}_{100}	Seria I/a	R	$1/64$	—	—	—
			163	$1/8$	—	—	—
27-30	163 form. 1^{0}_{100}	Seria I/a	R	$1/32$	—	—	—
			163	$1/32$	—	—	—

Observații:

animalele din seria I. au fost examinate după 1 lună, iar cele din seria a II-a după 2 luni de la vaccinări. Seria I/a s-a examinat după 3 săptămâni de la inoculări.

M = mediul de cultură pentru virus

* = în cercetări de seroneutralizări s-a folosit virusul cu care sa imunizat.

Tabelul VIII

Rezultatele reacției de fixare a complementului efectuat din serul hamsterilor,
după 3 săptămâni de la vaccinare.
(Data vaccinărilor: 26, 28 dec. 1964 și 4. I. 1965.
Infecțare cu virusul viu omolog la 6. II. 1965.)

Nr. crt.	Virusul cu care s-a imunizat	Titru l	
		anticorpilor fixatori de complement față de virus	
		163 S	R
1	163 form. 0,05%	$1/64$	$1/64$
2	163 form. "	$1/32$	$1/32$
3	163 form. "	$1/64$	$1/8$
4	163 form. "	$1/8$	$1/16$
5	163 form. "	$1/8$	$1/16$
6	163 form. "	$1/128$	$1/64$
7	R form. "	$1/123$	$1/64$
8	R form. "	$1/128$	$1/8$
9	R form. "	$1/128$	$1/128$
10	R form. "	$1/8$	$1/2$
11	R form. "	$1/128$	$1/128$
12	R form. "	$1/128$	$1/8$
13	V/6 form. "	$1/8$	neg.
14	V/6 form. "	$1/16$	$1/4$
15	V/6 form. "	$1/16$	$1/4$
16	V/6 form. "	$1/8$	neg.
17	V/9 form. "	$1/16$	$1/16$
18	V/9 form. "	$1/32$	$1/16$
19	V/9 form. "	$1/128$	neg.
20	V/9 form. "	$1/32$	$1/8$

Observații:

form. = tratarea virusurilor pentru inactivare cu 0,05% formalină neutră