

## INFECȚIA LATENTĂ A CULTURILOR CELULARE CU VIRUSUL COXSACKIE A<sub>4</sub>\*

Al. Abrahám, E. Bálint, Matilda Bara

În ultimul timp cercetătorii se ocupă tot mai mult de izolarea, tipizarea și procesul de multiplicare a virusurilor în culturi de celule. În acest fel s-au obținut rezultate mult superioare celor de pe animale sensibile sau de pe ou de găină embrionat. Totuși, unele virusuri nu provoacă efect citopatic (e.c.p.) pe unele culturi de celule, din care cauză majoritatea cercetătorilor au exclus posibilitatea multiplicării acestor virusuri în culturi de celule așa zise nesusceptibile.

În prezenta lucrare am căutat să obținem un răspuns la întrebarea, dacă virusul Coxsackie A<sub>4</sub>, trecut pe culturi celulare nesusceptibile, își menține patogenitatea față de animale receptive, se multiplică sau este inactivat, eventual distrus.

Mecanismul de interacțiune a virusurilor cu celule susceptibile, formulat asupra ciclului intracelular în dezvoltarea virusului Sendai (9), a arătat modul de adsorbție a virusului pe aparatul receptor al celulei. Trecerea barierelor celulare și pătrunderea virusului în celulă, precum și eliberarea acidului său nucleic virotic din învelișurile proteice, coincide cu prima fază a multiplicării virusului. După această perioadă virusul, respectiv acidul său nucleic, pătrunde și se localizează în nucleoli, de unde migrează înspre nucleu și de acolo în citoplasmă. Aici are probabil loc sinteza și acumularea de proteine noi; urmează migrarea lor spre periferia celulei și această ultimă fază se termină cu stirbirea citoplasmei, eliberarea noilor particule virotice.

Procesul de multiplicare virală este un proces strict intracelular. Materialul genetic viral este integrat funcțional și preia totodată rolul coordonator în mecanismul de sinteză a celulei, prin devierea căruia se formează noul material (5). Virusul, format în ultima etapă al acestui proces de înmulțire, se eliberează din celulă treptat (în cazul fagului brusc), lizând celula mamă.

În studiul multiplicării virale, acidul ribonucleic „mesager” joacă rolul unui precursor ribosomal care formează partea semnificativă și activă a acestuia (1).

Reproducerea virusurilor poate fi suprimată însă prin inhibitori care blochează producția sau utilizarea energiei, sau prin compuși care interferează cu incorporarea aminoacizilor, eventual a constituentelor nucleotizilor. Virulența, celula și temperatura sint factorii principali care decid dacă în celulă se va forma interferon sau virus (8).

În cercetarea noastră ne-am ocupat de multiplicarea virusului Coxsackie A<sub>4</sub> în culturi de celule nereceptive pentru acest virus.

### Material și metode

Virusul Coxsackie A<sub>4</sub>, izolat la Tîrgu-Mureș și tipizat față de serul specific anti-Coxsackie A<sub>4</sub> furnizat de Institutul „Dr. I. Cantacuzino” din București, a fost folosit într-o diluție de 10<sup>-1</sup>, adăugînd fiecărui tub (care va conține 2 ml de mediu) o cantitate de 0,2 ml. În acest fel diluția incipientă în culturile de celule a fost de 10<sup>-2</sup>. Această diluție crește în pasaje succesive, înzecîndu-se.

Testarea virusului s-a efectuat pe culturi de celule fibroblastice de rinichi de embrion uman (REU) și pe următoarele linii celulare: CM, HEP<sub>2</sub>, KB, Detroit-6

\* ) U.S.S.M. Tg.-Mureș, 17. XII. 1964.

(D<sub>6</sub>). Culturile infectate au fost menținute fie în aparatul rotativ, fie în tuburi statice la temperatura de 37°.

Mediile de cultură întrebuințate au fost: mediu de creștere (lichidul Hanks + Earle în cantitate egală), iar ca mediu de întreținere am folosit lichidul Earle cu un adaos de 2,5% ser de vițel.

În general am efectuat 10 pasaje succesive. După pasaje cu pereche, lichidul din mediu l-am trecut la animale receptoare, șoricei nou-născuți.

În culturile CM din tuburile rotative, e.c.p. s-a manifestat până în pasajul V, după care a urmat până în pasajul X alternarea efectului pozitiv cu cel negativ. În culturile KB, D<sub>6</sub> și HEP<sub>2</sub> nu am observat e.c.p. în primele pasaje. În pasajul II și III la culturile KB, în pasajul II la D<sub>6</sub>, în pasajul III, IV și V la HEP<sub>2</sub> s-au marcat e.c.p. vizibile. În continuarea pasajelor e.c.p. a dispărut complet (tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1.  
(Rotative)

Nr. de subcultură	Efect citopatic				Inocularea lichidului la animale
	Tipul culturilor				
	CM	KB	D <sub>6</sub>	HEP <sub>2</sub>	
I.	+	-	-	-	
II.	+	+	-	-	șoricei au reacționat pozitiv
III.	+	+	+	+	
IV.	+	+	-	+	șoricei au reacționat pozitiv
V.	+	-	-	+	
VI.	±	-	-	-	șoricei au reacționat pozitiv
VII.	-	-	-	-	
VIII.	±	-	-	-	șoricei au reacționat pozitiv
IX.	-	-	-	-	
X.	-	-	-	-	șoricei au reacționat pozitiv

În cazul culturilor din tuburile statice e.c.p. a fost observat la celulele REU (pasajul II, IV); KB (pasajul VI, VII și VIII); D<sub>6</sub> (pasajul VI, VII și VIII); CM (pasajul I, II, IV, VI, VII); HEP<sub>2</sub> (pasajul III, IV, VI, VII, tabelul nr. 2).

Extractul ARN al virusului Coxsackie A<sub>4</sub> (după metoda uzuală cu fenol), care a provocat întotdeauna paralizia șoriceilor, a fost inoculat pe linii de celule CM și HEP<sub>2</sub> însă fără să fi observat vreun e.c.p.

În cazul inoculării lichidului de cultură din pasajele cu pereche la șoricei nou-născuți, aceștia din urmă au prezentat paralizie și au sucombat la 4-6 zile după infecție, deci cu o zi mai târziu decât în cazul virusului inițial. Același efect l-am obținut și prin inocularea lichidului de cultură al tulpinilor CM și HEP<sub>2</sub>, infectate anterior cu ARN-ul extras din virusul Coxsackie A<sub>4</sub>.

Paralizia, respectiv sucombarea șoriceilor sugari, a putut fi oprită prin neutralizarea virusului din mediul de cultură, adăugându-i-se cantitatea respectivă de ser anti-Coxsackie specific A<sub>4</sub>.

Tabelul nr. 2.  
(Staționare)

Nr. de sub-cultură	Efect citopatic					Inocularea lichidului la animale
	Tipul culturilor					
	EU	KB	D <sub>6</sub>	CM	HEp <sub>2</sub>	
I.	—	—	—	+	—	
II.	+	—	—	±	—	șoriceii au reacționat pozitiv
III.	+	—	—	—	±	
IV.	+	—	—	+	+	șoriceii au reacționat pozitiv
V.	—	—	—	—	—	
VI.	—	+	+	+	±	șoriceii au reacționat pozitiv
VII.	—	+	±	+	+	
VIII.	—	±	+	—	±	șoriceii au reacționat pozitiv
IX.	—	—	—	—	—	
X.	—	—	—	—	—	șoriceii au reacționat pozitiv

+ = e. c. p.

± = e. c. p. dubios

— = e. c. p. negativ

### Discuții

Pînă în prezent nu se știe dacă virusul Coxsackie A<sub>1</sub> se înmulțește în culturi celulare (în afara tipului A<sub>9</sub>), deoarece nu s-a produs e.c.p. Nu s-a pus problema formelor latente ale acestui virus din culturi celulare.

Începînd din anul 1957, cînd *Isaacs* și *Lindenmann* au descoperit o substanță solubilă, denumită de ei „interferon” și eliberată de către celulele membranei corioalantoidiene a oului embrionat de găină, inocuat cu virus gripal inactivat, s-a pus problema interferenței între celulă și virus, în care caz inhibitorul s-ar elibera spontan dintr-o celulă.

Unii autori (7, 10) susțin că rezultatele infectării unor culturi variază între leziuni invizibile și distrucții celulare complete. Ori fiecare celulă este susceptibilă față de particulele virale — în care caz acestea din urmă se multiplică repede, distrugînd celula — ori fiecare celulă este rezistentă față de virusuri. În alte cazuri cresc celule presupuse normale, însă din acestea se pot pune în evidență virusurile introduse anticipat, observîndu-se eventual și multiplicarea lor.

În cazul apariției interferonului, se presupune că acesta nu blochează total sinteza virală, deci nu distruge, nu inactivează ARN în interiorul celei gazdă (6).

Celulele infectate cu virusul Coxsackie A<sub>1</sub> nu prezintă alterări în fiecare pasaj succesiv pînă la 7 zile, cît au stat sub observația noastră. Aceasta nu înseamnă că virusurile nu persistă, respectiv nu se înmulțesc în aceste culturi. Rezultatele însă nu pot fi apreciate din cauza celulelor normale și rezistente chiar și în cazul apariției unor e.c.p. dubioase.

Virusul Coxsackie A<sub>1</sub> produce inițial paralizia șoricelilor nou-născuți pînă la un titru de  $10^8$ . Dacă infectarea culturilor celulare s-a efectuat la început cu un virus la titrul de  $10^2$ , atunci în subculturile următoare acest titru se diluează: în pasajul II la  $10^3$ , în pasajul III la  $10^4$ , obținindu-se în pasajul X un titru de  $10^{-12}$ . Se știe că la acest titru virusul Coxsackie A<sub>1</sub> nu mai produce în mod normal paralizia și sucombarea șoricelilor nou-născuți, iar dacă șoricelii infectați cu această diluție vor prezenta paralizii, respectiv vor sucumba, înseamnă că avem de a face cu multiplicarea virusului respectiv și nu cu persistența pasivă a virusului inițial din culturi de celule.

Multiplicarea virusului dovedește și reintegrarea completă în cazul infecției celulelor CM și HEP<sub>2</sub> cu ARN de proveniență virală. În aceste cazuri celulele nu mai prezintă leziuni caracteristice, totuși, chiar și cu lichidul din pasajul IV, am provocat paralizii și sucombarea animalelor

Infecția cronică a celulelor din cultură (3) nu se manifestă întotdeauna cu e.c.p. vizibil. Desigur că manifestarea e.c.p. este influențată de pH-ul mediului și de căldură (2).

### Concluzii

1. Virusul Coxsackie A<sub>1</sub> persistă și se multiplică în unele culturi de celule sub formă latentă, nemanifestîndu-se reacția celulelor din subculturi în mod evident.

2. Reacția virus-celulă gazdă apare în primele 7 zile de contact, fiind uneori vizibilă (în care caz vorbim de e.c.p.), iar alteori, nefiind detectabilă la microscop, ci numai prin infectarea animalelor respective.

3. Dezvoltarea inhibitorilor în celulă gazdă nu inactivează virusul, nu îl oprește în dezvoltarea și multiplicarea sa, dar pare să încetineze acest proces.

*Sosit la redacție: 17 iunie 1965.*

### Bibliografie

1. ALTESCU E. I.: Microbiol.-Parazit.-Epidemiol. (1963), 5, 386;
2. BORING D. W., LEVY R. S.: J. Immunol. (1962), 88, 394;
3. CROWREL L. R.: J. Bacteriology (1963), 86, 517;
4. DANIELESCU C., ADERCA J., IFTIMOVICI M.: Șt. Cerc. Inframicrobiol. (1963), 2, 188;
5. FENYVES A.: Microbiol.-Parazit.-Epidemiol. (1963), 3, 207;
6. GROSSBERG E. S., HOLLAND J.: J. Immunol. (1962), 88, 708;
7. HENLE W.: J. Immunol. (1963), 91, 145;
8. ISAACS A.: Proc. Soc. Med. (1962), 55;
9. JDANOV V. M., ALLA BUKRINSKAIA: Șt. Cerc. Inframicrobiol. (1963), 2, 119;
10. MANTO HO: Engl. J. Med. (1962), 266, 1258;
11. POPESCU M.: Șt. Cerc. Inframicrobiol. (1963), 2, 217.