

UNELE ASPECTE ALE MULTIPLICĂRII VIRUSULUI HEPATITEI A

dr. I. László, Iuliana Both, V. Filep

Cercetările efectuate în cursul anului 1975 de către *Hawkes* și colab. (1), *Fay* și colab. (2), respectiv ale lui *Dienstag* și colab. (3) confirmă prezența unor particule virale în materiile fecale ale bolnavilor de hepatită de tip A, pe care pe baza proprietăților imunologice le putem considera ca agenți etiologici ai hepatitei A.

Prin aplicarea metodei de imunolectronmicroscopie (IEM) (4) s-a arătat că particulele asemănătoare virusurilor au dimensiuni de 27 nm și sînt absente la bolnavii cu hepatită B și în materiile fecale ale persoanelor sănătoase.

Faptul că virusuri identice din punct de vedere morfologic și imunologic s-au izolat la Rosario (Argentina) și la San Diego (California) din cazuri de hepatită, în care infecția cu virusul hepatitei B a putut fi exclusă, a adus noi argumente cu privire la existența unui virus hepatotrop specific pentru hepatita de tip A.

Transmiterea virusului A la cimpanzei — după cum reiese din lucrarea lui *Dienstag* și colab. (5) — la care a apărut o hepatită acută cu modificări biochimice, histologice și clinice evidente, subliniază din nou rolul virusurilor de 27 nm în hepatita A.

În prima etapă a cercetărilor noastre legate de etiologia hepatitelor virale (1957—1967) am putut demonstra în produsele patologice ale bolnavilor, prezența unor virusuri, cu dimensiuni reduse de 15—30 nm și cu tendință de așezare în formă de agregate de 70 nm în șiruri simetrice, sau în interiorul unor vacuole din citoplasmă și mai rar în nucleu. Caracteristica cea mai evidentă a acestor virusuri este replicarea lentă pe linii primare umane sau linii celulare și efectul citopatogen inconstant ce apare abia după 7—14 zile de la infectare.

Avînd în vedere, că în cazul virusului hepatitei A cultivarea pe linii celulare nu a dat rezultate dorite, sau chiar nu a putut fi încă rezolvată. după cum menționează și *Maynard* și colab. (6) și că determinarea prezenței virusului în produsele patologice ale bolnavilor se bazează pe metoda laborioasă de IEM, se impune ca cercetătorii să studieze condițiile de replicare a virusurilor hepatitei A.

Datorită faptului că adenovirusurile facilitează replicarea acestor virusuri pe linii celulare și în ficatul hamsterilor, am considerat că virusurile hepatitei A și B sînt virusuri defective, iar adenovirusul se comportă în acest caz ca un virus auxiliar (helper virus).

Material și metodă

1. *Linii celulare*: celule KB și Detroit-6 (VA). Mediul de creștere a fost mediul M 199 sau Eagle cu ser de vițel 10% și antibiotice în cantități prevăzute în formula mediului. Mediul de menținere (pentru cultivarea virusurilor) a fost mediul Eagle cu ser agamaglobulinic de vițel 0,5—2 %.

2. *Cultivarea simultană a virusurilor* izolate din hepatită și adenovirusul tip 3. În cele 30 de serii de experiențe (1974—1977) au fost studiate următoarele tulpini de virusuri: R, P—400, 208, 439, 440, 441, P—396, Hs 466, HBs 461, 286, F—467, F—501, F—502, F—503, F—504, Hs 496, Hs 497 etc. Culturile de celule au fost infectate cu 0,1 cc adenovirus tip 3 nediluat, iar după 30 de minute de repaos la temperatura camerei și spălarea culturii cu tampon S.S.T. pentru îndepărtarea excesului de virus nefixat de celule, s-a făcut suprainfectarea cu 0,3 cc de virus hepatitic nediluat. Celulele astfel tratate au fost menținute încă 30 de minute la temperatura camerei, apoi după adăugarea mediului de menținere au fost păstrate la 37 °C. Examinarea modificărilor de la nivelul celulelor infectate s-a făcut zilnic. Concomitent au fost infectate celule pentru martor virus hepatitic.

3. După apariția efectului citopatogen (ECP) marcat, unele recipiente cu celulele alterate au fost supuse de trei ori la congelare și decongelare, pentru obținerea unei suspensii virale necesare trecerilor succesive și pentru a obține antigenele virale necesare imunoprecipitării în gel de agaroză. Purificarea și concentrarea antigenelor le-am efectuat cu Fluorocarbon și dializă față de polivinilpirolidon 20 %.

4. *Inoculare la hamsteri*. Un număr de 39 de hamsteri — împărțiți în 7 loturi — au fost infectați pe cale i. peritoneală simultan cu 0,2 cc de virus hepatitic și 0,5 cc de adenovirus tip 3. Un lot de 6 animale a fost infectat numai cu adenovirus tip 3 și un lot de 7 animale cu o tulpină „hibridizată“ în prealabil (tulpina P—396) și menținută pe celule prin treceri succesive pînă în momentul folosirii. După 6 săptămîni de la infecție animalele au fost sacrificate, ficatul lor fiind prelucrat din punct de vedere histopatologic și electronmicroscopic, includerea fragmentelor fiind efectuată în Durcupan. Examinarea ultrasecțiunilor s-a făcut cu ajutorul microscopului electronic TESLA BS 613.

Studiul electronmicroscopic al celulelor infectate s-a efectuat conform metodelor uzuale.

Rezultate

1. *Rezultatele cultivării simultane a virusurilor hepatitice și adenovirusul tip 3*. Din observațiile efectuate pe cele 30 de serii de cultivare reiese că virusurile hepatitice în prezența adenovirusului modifică după 2—5 zile de la infecție aspectul morfologic al celulelor astfel infectate, ceea ce se manifestă prin rotunjirea tuturilor celulelor, fără a păstra continuitatea pinzei celulare. La martori cu adenovirus domină apariția unor agregate de celule și formarea unor celule mai alungite, care după 4—5 zile se rotunjesc.

Celulele infectate numai cu virus hepatitic, prezintă mici alterări în focare cu celule rotunde. ECP apare tardiv, abia după 7—14 zile de la infectare.

I. LASZLO SI COLAB.: UNELE ASPECTE ALE MULTIPLICĂRII
VIRUSULUI HEPATITEI A



Fig. nr. 1: Nucleul celulei KB. Virusul Hs 466 cultivat simultan cu adenovirus tip 3. Particule virale de 40—50 nm (VH) în zone compacte care corespund virusurilor hepatice A, adenovirusuri (AD) și virusuri cu dimensiuni de peste 150 nm (CV).
Mărire: 30.000 X

LASZLO ȘI COLAB.: UNELE ASPECTE ALE MULTIPLICĂRII
VIRUSULUI HEPATITEI A

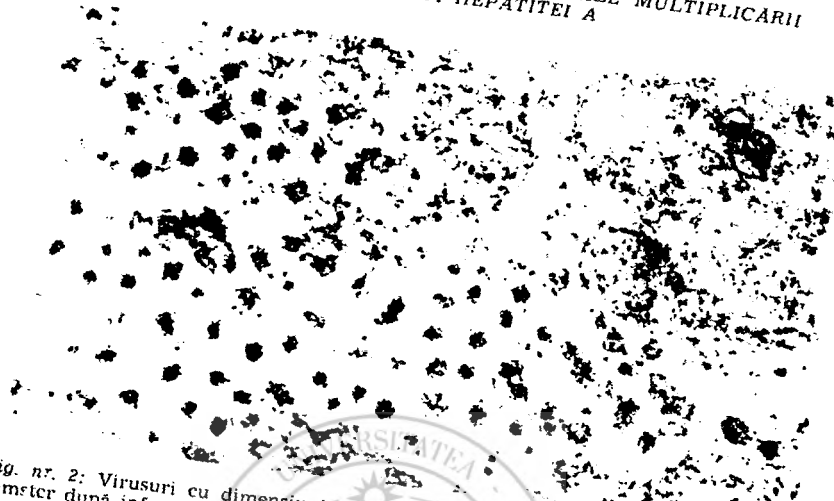


Fig. nr. 2: Virusuri cu dimensiuni de 60-100 nm în citoplasma unui hepatocit de hamster după infecție cu virus hepatitic (P-396) și adenovirus tip 3. Mărire 40.000 X

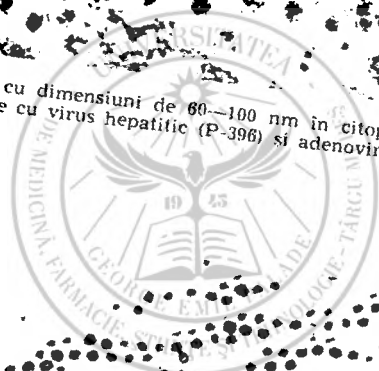


Fig. nr. 3: Adenovirusul tip 3 în nucleul unei celule KB. Mărire: 37.000 X

Examinările electronoptice confirmă replicarea simultană a celor două virusuri în special la nivelul nucleului și slab în citoplasmă.

În nucleul celulelor se găsesc simultan:

- adenovirusuri cu dimensiuni de 70—90 nm, unele avînd tendință de așezare în formă de cristale tipice pentru aceste virusuri, iar altele fiind dispersate inegal;
- particule sferice de 25—30 nm, uneori așezate în masă densă sau dispersate inegal în nucleoplasmă;
- formațiuni de cca 40—45 nm cu margini neregulate, fără miez central (particule virale incomplete?);
- particule sferice, ovale sau cu margini neregulate de cca 180—250 nm.

2. *Cercetările imunologice* efectuate cu serul bolnavilor de hepatită și antigenele preparate de noi după cultivarea simultană a celor două virusuri, arată următoarele:

Din 269 de seruri recoltate de la bolnavi cu hepatită, în anii 1976—1977, în 44 de cazuri s-au găsit anticorpi din care în 23 de probe față de adenovirus și 21 de cazuri față de virusurile cultivate simultan.

Antigen specific pentru adenovirusul 3 a fost prezent în 16 seruri iar antigen HVA (hepatita virală A) la 12 bolnavi.

Față de rezultatele constatate în 1975 cînd antigenul viral hepatitic a fost prezent în 21,7 % a cazurilor în 1976 acesta a fost prezent doar în 7,8 %.

Scăderea incidenței anticorpilor și a antigenelor virale în serurile cercetate ridică posibilitatea apariției unor noi serotipuri de virusuri hepatitice în perioada studiată. (1976 august—1977. nov.)

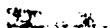
3. *Cercetările histopatologice* ale ficatului de hamster sînt cuprinse în tabelul următor:

Lot de animale	Apariția țesutului conjunctiv sau a cirozei		
	Pozitiv	Negativ	Total
1. Ser HBs 479—530	—	3	3
2. Ser HBs 479—530 + adenovirus 3	4	1	5
3. Virus HBs 461 + adenovirus 3	5	1	6
4. Virus 493 + adenovirus 3	4	3	7
5. Virus 490 + adenovirus 3	2	3	5
6. Virus P—396	7	—	7
7. Adenovirus tip 3	—	6	6
Total	22	17	39

Menționăm că patogenitatea tulpinilor de virus hepatitic HBs 479, HBs 530, HBs 461 (virusuri hepatitice B) 493, 490, a fost moderată față de hamsteri, cu excepția tulpinii P—396, care conține virusuri de 28—30 nm și de 70—90 nm (virus hepatitic și adenovirus) însă virusurile hepatitice asociate cu adenovirus în 54 % a cazurilor produc leziuni apreciabile la nivelul ficatului, care apoi evoluează spre ciroză.

Examenul electronoptic al ficatului hamsterilor confirmă prezența particulelor virale în celulele hepatice, alterările ultrastructurale ca dispariția ergastoplasmei, diminuarea granulelor RNP, umflarea mitocon-

drilor cu dispariția structurii interne, dispariția glicogenului etc., fiind mai evidente la nivelul citoplasmei.



Discutarea rezultatelor și concluzii

Deși absența incluziilor nucleare în celulele hepatice ale bolnavilor nu pledează pentru participarea adenovirusurilor în declanșarea hepatitelor virale, cercetările noastre recente — in vitro și pe animale —, confirmă rolul și importanța lor în această boală.

Menționăm însă, că Nicolau (7) este de părere că triada I.N.K. (incluzii nucleare, nucleoli monstruoși, cariochineze atipice) constituie semnele caracteristice ale infecțiilor cu virusuri hepatitice. Aceste modificări au fost prezente la nivelul hepatocitelor umane, iar noi, încă în 1960, am demonstrat prezența lor în ficatul hamsterilor infectați cu serurile obținute de la bolnavi cu hepatită. Prin urmare, incluziile nucleare fiind tipice pentru infecția cu adenovirus, este încă o dovadă în plus pentru rolul acestor virusuri în declanșarea hepatitei.

Rezultatele cercetărilor noastre serologice (8) arată că răspunsul imunologic al organismului față de tulpinile cultivate simultan („hibridizate“) este mai intensă decât față de tulpinile adeno sau virus hepatitic.

Observațiile noastre recente cu privire la multiplicarea virusurilor hepatitice pe linia celulară KB, de fapt sînt identice cu cele constatate încă în perioada 1957—1967 ș.a. că virusul hepatitei A și B, după caracterele morfologice, biologice și de patogenitate nu se poate include în grupele virusurilor cunoscute. Ele fiind incomplete, defective, nu dau un ECP apreciabil, multiplicarea lor este foarte lentă și este condiționată de un virus auxiliar, care facilitează apariția alterărilor caracteristice la nivelul celulelor infectate.

Incidența redusă a anticorpilor specifici față de tulpinile izolate, precum și a antigenelor în serurile bolnavilor de hepatită, presupune apariția unui (sau a unor) nou tip de virus hepatitic în perioada actuală, care modifică nu numai posibilitățile de identificare a virusurilor, ci și epidemiologia hepatitei virale.

Sosit la redacție: 15 noiembrie 1977

Bibliografie

1. Hawkes R. A., Broughton C. R., Grohman G.: Memo H—974/1 Dec. 1975;
2. Fay O. H., Bakela J. B., Mosley J. W.: Memo H—975/1 Dec. 1975;
3. Dienstag I. L., Purcell R. H., Tyeryar F., Pelon W.: Memo H—978/1 Dec. 1975;
4. Feinstone S. M., Kapikian A. Z., Purcell R. H.: Science (1973), 182, 1026;
5. Dienstag J. L. et al.: J. inf. dis. (1975), 132, 5, 532;
6. Maynard J., Seger R., Boyer K. et al.: Memo H—708/1, 1974;
7. Nicolau Șt. S.: Hepatitele infecțioase inframicrobiene. Ed. Academiei R.P.R., București, 1957;
8. László I., Filep V., Péter M., Sabău M., Domokos L., Both I., Piros M. Sanda, Kovács A., Kasza L., Palencsár A.: Sesiunea anuală de comunicări. Centrul de cercetări medicale, Tîrgu-Mureș, 1 febr. 1975.

SOME ASPECTS OF THE MULTIPLICATION OF HEPATITIS A VIRUS

According to the experiments made, the authors were able to underline again the fact that hepatitis A and B viruses on account of their morphological and biological characteristics cannot be included in the groups of well-known viruses. The defective feature of virus A can be noted in its replication, too, as it develops on cellular lines only in the presence of a helper virus. After the simultaneous cultivation of hepatitis virus and the helper virus — adenovirus —, spherical viral particles of 25—30 nm and about 40—45 nm, respectively, appear in the nucleus and more rarely in the cytoplasm. Sometimes, besides the helper adenovirus, in the infected cell nucleus some ovular, spherical particles occur having the size of about 180—250 nm. The presence of virions could be proved by electronoptical examinations in the liver of the infected hamsters, too. According to the serological researches in the past two years, besides viruses A and B there seems to be a new type of virus which causes sporadic cases.