

IZOLAREA VIRUSULUI COXSACKIE DIN CAZURI DE POLIOMIELITA*)

Abrahám Sándor, Lőrincz Pál

Dalldorf și *Sickles* au izolat pentru prima oară în anul 1948 virusul Coxsackie (virusul „C”) din materialele fecale a doi copii suspecți de poliomielită. Din numeroasele publicații care s-au ocupat de această problemă a reieșit că virusul este răspândit în toată lumea. În cercetările noastre am avut ocazia să izolăm mai multe tulpini ale virusului „C” din cazuri de herpangină și de la bolnavi poliomielitici. Mai târziu a reieșit că virusul „C” a fost pus în evidență nu numai din cazuri de herpangină și poliomielită, ci și de la bolnavi de mialgie epidemică, gripă de vară și meningită seroasă infantilă de vară. În general s-a ajuns la concluzia că toate aceste maladii sînt cauzate de virusul „C”.

Pînă în momentul de față nu este precizată legătura virusului „C” cu boala poliomielitică. Pe baza datelor reiese că punerea în evidență a virusului „C” nu a fost cu puțință în toate maladiile poliomielitice. La început s-a ivit concepția că bolile ușoare de poliomielită — cu pareze trecătoare — ar fi provocate de virusul „C”. Mai târziu însă s-a izolat virusul din măduva spinării la bolnavii decedați în poliomielită. Noi am obținut rezultate analoge.

Melnick, Walton și *Myers* au pus în evidență virusul „C” cit și virusul poliomielitei de la bolnavii poliomielitici. Efectuînd depistări la familia și prietenii bolnavului, am găsit prezența virusului „C” atît la frații cit și la unii din prietenii bolnavului — care dealtfel prezentau simptome de herpangină — însă lipsea prezența virusului poliomielitice. Serul adulților conlocuitori conținea anticorpi neutralizanți ai virusului „C” tip A₂, nu însă anticorpii neutralizanți ai virusului poliomielitice.

Wesenmayer (1938) arată că cei trecuți prin infecția virozei „C” nu se îmbolnăvesc de poliomielită. După *Dalldorf*, șoarecii tratați cu virusul

* Comunicare făcută la cea de a II-a sesiune științifică a I.M.F. din Tg.-Mureș, la 26. oct. 1957

poliomielitic de tip Lansing sînt imuni față de viroză „C”. *Johnsson* descrie o epidemie de poliomielita precedată de o epidemie a virozei „C”. *Dalldorj* și *Albrecht* au demonstrat prin experiențe efectuate pe șoareci albi posibilitatea interferenței între cele două virusuri. Cercetările efectuate în unele țări, în special în Olanda au arătat că epidemia de pleurodinie a succedat epidemia de poliomielită. În schimb în orașul New-York au observat întirzierea graficului epidemiei poliomielitice care s-ar datora epidemiei virozei „C” care l-a precedat.

În lucrarea de față ne-am propus izolarea virusului „C” de la 28 bolnavi de poliomielită — sau presupuși poliomielitici — aflați la clinica de boli infecțioase, în primăvara-vara anului 1956. Pentru aceasta am folosit materiile fecale și lichidul cefalo-rahidian al bolnavilor.

Pentru punerea în evidență a virusului poliomielitic, nu ne-au stat la dispoziție culturi de țesuturi, culturi de celule HeLa sau maimuțe, de aceea ne-am permis să întrebuițăm ca metoda, cea descrisă de *Martin Louis André* și colab. În acest fel am căutat să verificăm și metoda precursorilor noștri.

Iată pe scurt metoda: extractul materiilor provenite de la bolnavi se inoculează iepurilor. Temperatura animalelor se ridică la 40—41° C după 3—4 zile de la inocularea. Stagnare 1—2 zile ca pe urmă să scadă fie brusc fie prin liză. Pieirea animalelor se produce în timpul apneei sau imediat după scăderea critică a febrei. Numai un mic procentaj (5—10%) din animale supraviețuiesc infecției și devin imune. La autopsie se observă splenomegalie. Agentul patogen se menține prin pasajele oarbe efectuate prin inocularea extractelor din măduva spinării și ficat. Dealtfel virusul este prezent în toate organele animalelor infectate.

Bolnavii noștri erau de diferite vârste. Unii sufereau de leziuni mai ușoare, alții de leziuni mai grave. Numai cîțiva s-au vindecat complet. Materialul pentru izolarea virusului l-am colectat după cîteva zile respectiv cîteva săptămîni de la debutul bolii. Redăm în cele ce urmează epicriza celor 6 bolnavi, de la care am reușit să izolăm virusul „C”.

I. I. Zs. în etate de 10 ani, este internată la 16. IX. 1956. Boala debutează cu febră (39° C) cu 3 zile înainte de internare. În ziua precedentă a simțit furnicătură în membru inferior drept, apoi după cîteva ore și-a simțit membrele inferioare slabe, iar mai tîrziu n-a mai putut sta în picioare. La internare mișcările active ale membrului inferior drept au dispărut. Reflexul rotilian abolit, reflexul Achilian păstrat. Mișcările active ale membrului superior drept diminuate, musculatura spatelui paretică. Lichidul cefalo-rahidian hipertensiv, reacția Pándy + + + +, r. Nonne-Appelt negativ. Citologie 94/3 în majoritate limfocite.

Este un caz de poliomielită cu pareza ușoară a membrului superior drept, și o monoplegie a membrului inferior drept. Pareza membrului superior a retrocedat rapid, grupele quadricepsului și a e aductorilor au fost mai intens legate de proces.

2 M. M. în etate de 7 luni este internată la 17. IX. 1956. Boala debutează cu 4 zile în urmă cu febră, apoi devine subfebrilă (37° C). În seara zilei precedente internării s-a observat că mișcarea activă a membrului inferior drept a dispărut. Lichidul cefalo-rahidian este foarte hipertensiv, r. Pándy + +, r. Nonne-Appelt neg., leucocite 29/3 (cu limfocite).

Este un caz de poliomielită spinală cu monoplegia completă a membrului inferior drept. Membru! cu toată hipotonia și atrofia ce- prezinta, arată o bună tendință de

reparare din punct de vedere funcțional și pînă la părăsirea clinicii bolnavul întrebunțează membrul inferior perfect. Se observă însă o slăbiciune a membrului în mișcare.

3. Zs. I. în vîrstă de 7 luni. Este adusă la clinică la 20. IX. 1956. De două săptămîni nu se poate sprijini pe membrul inferior drept. Puncția lombară relevă un lichid normotensiv, clar, r. Pándy ++, r. Nonne-Appelt negativ. Citologie 130/3 limfocite.

Poliomielită forma spinală, cu monopareza membrului inferior drept. Arată o bună tendință de reparație. Musculatura abdominală și-a spatele care de asemenea au fost atinse, retrocedează mai repede, pareza membrului inferior mai încet. La părăsirea clinicii bolnavul poate șede, își mișcă ambele membre inferioare, puterea mușchilor i-a revenit la normal. După un control efectuat la 4 uni de la ieșirea din spital se remarcă atrofia marcată a mușchilor din grupa quadriceps și slăbiciunea lor. Își întrebunțează cu cruțare membrul atins.

4. D. E. în vîrstă de 8 luni. Se internează la 1. X. 1956 cu o anamneză de 5 zile. Este febrilă, în prostrație. De două zile a survenit o pareză facială, dreaptă, care mai tirziu a revenit complet. Lichidul cefalo-rahidian ușor hipertensiv, clar, r. Pándy ++, r. Nonne-Appelt negativ. Citologie 158/3 în majoritate limfocite.

5. M. E. de 18 luni. Este adusă la clinică la 3. X. 1956. Boala a debutat cu 4 zile înainte, cu febră, prostrație, vărsături. În ziua internării survine pareza facială stîngă și monoplegia membrului inferior stîng. Lichidul cefalo-rahidian normotensiv, clar, r. Pándy ++. Citologie 160/3 limfocite.

Poliomielită spinală combinată cu pareză facială, cu atrofie marcată a mușchilor feșieri și o proastă tendință de reparație.

6. M. D. de 2 ani. Este adusă la clinică în ziua de 19. VIII. 1956. Boala a debutat de 3 zile cu febră rezistentă la tratamentul anterior cu antibiotice. Puncția lombară scoate în evidență un lichid hipertensiv, r. Pándy +, r. Nonne-Appelt negativ, citologie 824/3. Repetat la 1 zi găsim 1289/3 limfocite. Clinic este o diplegie inferioară cu areflexie totală. Tabloul clinic se înrăutățește din oră în oră, cuprinderea progresivă a musculaturii etajelor superioare, apoi bolnavul sucombă în urma parezei respiratorii.

De la primul caz am recoltat fecalele în a 6 zi de boală, iar lichidul c.r. în ziua 8-a. Materialele preparate — conform tehnicii descrise în comunicările anterioare — au fost inoculate animalelor nou născute.

La grupa celor inoculați cu materiile fecale, au survenit paralizia animalelor în ziua 3-a infecției, în a 5-a zi toate animalele au paralizat respectiv au pierit. Cu acest material am efectuat 3 pasaje succesive. În pasajele ulterioare pierirea animalelor s-a stabilit la 3 zile de la infecție.

Cu lichidul c.r. am inoculat animale asemănătoare. Paraliziiile au survenit la 3—4 zile de la infecție. Virusul s-a dovedit pasabil.

Cu materiile fecale, respectiv lichidul c.r. am inoculat iepuri. Animalele au stat sub observația noastră 3 săptămîni fără să fie manifestat simptome patologice, temperatura rămînd constantă. La unele animale am efectuat autopsii fără să fi observat splenomegalii. Virusul izolat (Coxsackie Mv₁₁) se află în păstrarea noastră în glicerină tamponată. Infecțiozitatea virusului a fost verificată prin pasaje multiple ulterioare la diferite date.

În cazul nr. 2. (Mv₁₂) am folosit materiile fecale și lichidul c.r. pentru izolarea virusului. Aceste materii le-am recoltat în zilele a 6. resp. a 8 ale bolii. Astfel am inoculat animale prin 5 pasaje succesive, obținînd paralizii și pierirea animalelor de experiență. În primul pasaj incubația a fost de 4 zile, care pe urmă a scăzut și s-a statornicit la 3 zile.

Infecția iepurilor a rămas negativă și în acest caz.

În cazul nr. 3 (Mv₁₃) am întrebuințat lichidul c.r. pentru izolarea virusului recoltat în a 15-a zi a bolii. Șoriceii au paralizat la 3—5 zile de la infecție. În pasajele ulterioare, paralizia și pieirea animalelor s-a stabilit la 3 zile. La iepurii infectați nu am observat nici un simptom patologic.

De la bolnavul nr. 4. (Mv₁₄), am recoltat materiile fecale în a 11-a zi de boală, iar de la bolnavului nr. 5. (Mv₁₅) în a 10-a zi de boală. În ambele cazuri incubația s-a stabilit la 3 zile. Iepurii infectați au dat rezultate negative.

Tabelul nr. i

Denumirea virusului Cocksackie	Ser I.	Ser. II.
Mv ₁₁	ziua 16	ziua 30
Mv ₁₂	" 14	" 34
Mv ₁₃	" 21	" 41
Mv ₁₄	" 22	" 31
Mv ₁₅	" 18	" 25

În cazul bolnavului nr. 6. (Mv₁₆) am folosit măduva spinării recoltată post-mortem. Materialul l-am menținut în glicerină tamponată timp de 14 zile. Primele paralizii la șoriceii inoculați cu acest material au survenit în a 4-a zi a infecției. În pasajele ulterioare aceasta s-a stabilit în 3 zile. Infecția iepurilor a fost fără rezultat.

Am efectuat titrarea virusurilor izolate. Toate virusurile Cocksackie izolate de noi, au dat paralizia șoriceilor în titrul de 10⁻⁶. Pentru

Tabelul nr. ii.

Ser reconvașcent I.					Ser reconvașcent II.				
Diluția virus	Serul	50 DL ₅₀ virus	Nr. ani-malelor inoculate	Nr. ani-malelor paralizate	Diluția virus	Serul	50 DL ₅₀ virus	Nr. ani-malelor inoculate	Nr. ani-malelor paralizate
10 ⁻¹	Mv ₁₁	Mv ₁₁	6	0	10 ⁻¹	Mv ₁₁	Mv ₁₁	5	0
10 ⁻²	Mv ₁₁	Mv ₁₁	6	3	10 ⁻²	Mv ₁₁	Mv ₁₁	5	0
10 ⁻³	Mv ₁₁	Mv ₁₁	6	6	10 ⁻³	Mv ₁₁	Mv ₁₁	5	0
10 ⁻¹	Mv ₁₂	Mv ₁₂	4	0	10 ⁻¹	Mv ₁₂	Mv ₁₂	6	0
10 ⁻²	Mv ₁₂	Mv ₁₂	7	1	10 ⁻²	Mv ₁₂	Mv ₁₂	6	0
10 ⁻³	Mv ₁₂	Mv ₁₂	5	2	10 ⁻³	Mv ₁₂	Mv ₁₂	8	0
10 ⁻¹	Mv ₁₃	Mv ₁₃	7	0	10 ⁻¹	Mv ₁₃	Mv ₁₃	6	0
10 ⁻²	Mv ₁₃	Mv ₁₃	6	0	10 ⁻²	Mv ₁₃	Mv ₁₃	5	0
10 ⁻³	Mv ₁₃	Mv ₁₃	7	0	10 ⁻³	Mv ₁₃	Mv ₁₃	6	0
10 ⁻¹	Mv ₁₄	Mv ₁₄	7	0	10 ⁻¹	Mv ₁₄	Mv ₁₄	6	0
10 ⁻²	Mv ₁₄	Mv ₁₄	7	2	10 ⁻²	Mv ₁₄	Mv ₁₄	6	0
10 ⁻³	Mv ₁₄	Mv ₁₄	6	6	10 ⁻³	Mv ₁₄	Mv ₁₄	6	0
10 ⁻¹	Mv ₁₅	Mv ₁₅	6	0	10 ⁻¹	Mv ₁₅	Mv ₁₅	5	0
10 ⁻²	Mv ₁₅	Mv ₁₅	7	7	10 ⁻²	Mv ₁₅	Mv ₁₅	5	0
10 ⁻³	Mv ₁₅	Mv ₁₅	6	6	10 ⁻³	Mv ₁₅	Mv ₁₅	5	0

neutralizarea virusurilor cu serul reconvalescent al bolnavilor în cauză, am întrebuițat 100 DL₅₀ cantitate de virus. Data obținerii serului reconvalescent este redată în tabelul nr. 1.

Primele seruri reconvalescente nu neutralizează în diluții 10⁻² și 10⁻³ 100 DL₅₀ de virus C, respectiv șoriceii inoculați cu aceste amestecuri au dat paralizii parțiale sau totale. Al doilea ser reconvalescent, obținut mai târziu, conține anticorpii neutralizanți în titru ridicat. Examinările de neutralizare sînt redată în tabelul nr. II.

Cu virusul Cocksackie Mv₁₂ și Mv₁₃ provenit de la bolnavii nr. 2 și 3, am efectuat neutralizări încrucișate cu rezultate negative. Serul reconvalescent al bolnavilor nu neutralizează virusurile celuilalt bolnav.

În cursul examinărilor histopatologice am observat dispariția striatelor în mușchii striati. În unele locuri s-a observat degenerarea mușchulară, în care au învadat nucleii de sarcolema împreună cu celulele mono și polinucleare. Creierul șoriceilor nu a arătat leziuni semnificative.



Virusul Cocksackie prin proprietățile sale biologice este foarte apropiat de virusul poliomielitei, *Schajfer* și *Chwerdt* au izbutit să cristalizeze virusul poliomielitei (MEF₁). *Maltern* și *Du Buy* însă au cristalizat mai recent virusul „C” tipul A₁₀. Se pare că între formele cristaline ale celor două virusuri sînt multe proprietăți comune. Unele simptome provocate de virusul „C” nici nu se pot diferenția de simptomatologia poliomielitice. Unii autori au pus în discuție izolarea virusului „C” din fecalele bolnavilor de poliomielită chiar și atunci cînd virusul poliomielitei nu a putut fi pus în evidență. În schimb s-a descris și contrariul. *Francis* și col. în decursul unei epidemii de viroză „C” și poliomielită au izolat din artropode strînse, ambele virusuri într-un mic procentaj. *Dalldorf* și *Albrecht* afirmă existența interferenței între cele două virusuri. *Howit*, *Melnick*, *Wesenmayer* și alții sînt de părere că persoanele trecute prin boala virozei „C” ar fi imune la o afecție poliomielitice. *Johnsson* a efectuat o asemănare între tipurile virusurilor „C”, izolate de la bolnavii poliomielitici și a ajuns la concluzia ca în nici un caz nu s-a pus în evidență în asemenea cazuri, virusul „C” tipul B. Acest tip de virus „C” preceda în general epidemiile poliomielitice producînd în cele mai multe cazuri meningitele seroase.

Pe baza celor de mai sus, cît și pe baza cercetărilor noastre se pare că virusul „C” este atît de apropiat de virusul poliomielitice, încît numai prin unele structuri antigenice foarte restrinse diferă identitatea lor.

Din cele 28 cazuri considerate poliomielitice, numai în 6 cazuri am putut pune în evidență virusul „C”. În multe cazuri a survenit pieirea animalelor la 48—72 ore după infecție. Acestea nu au dat paralizii, deci nu le-am pasat succesiv, le-am scos din experiența ca fiind negative. Mai târziu însă a reieșit, că în general paralițiile survin în timpul nopții, iar animalele pier la 1—2 ore de la paralizie. Aceste paralizii nocturne — posibil frecvente — nu le-am observat și prin aceasta se explică procentajul atît de scăzut în posibilitatea izolării virusului „C”.

Între bolnavii noștri am observat paralizii de diferite tipuri și de diferite gravități. Totuși numai în 5 cazuri a rezultat punerea în evi-

dență a virusului „C” și într-un caz din măduva spinării unui cadavru poliomielitice confirmat prin disecție și histopatologie.

Reacțiile de neutralizare efectuate cu serul bolnavilor, rezultatele pozitive ale acestora pledează pe lângă prezența virusului „C”, relația acestuia cu simptomele observate, îndepărtează totodată ipoteza de suprainfecție epidemică (contaminarea unui bolnav de la celălalt cu virus „C”). Rezultatele reacțiilor de neutralizare încrucișată arată prezența virusurilor „C” aparținând diferitelor tipuri.

Tipizarea virusurilor „C” nu am efectuat-o, deoarece nu ne stau la dispoziție serurile tip. Ivirea paralizațiilor, evoluția lor și examinările histopatologice efectuate pe animale dovedesc că virusurile „C” izolate de noi aparțin tipurilor de virus Cocksackie „A”.

Prezența virusului poliomielitice, prin metoda descrisă de *Martin Louis André* și colab. nu a putut fi dovedită. Dealtfel acest fapt l-a mai negat și *Pellegrin* și *Campana* utilizând această metodă.

Sosit la redacție: la 30 decembrie 1957.

Bibliografie

1. ABRAHAM: Tájékoztató, 1957, 1, 10; 2. BALDUCI, FELICI: G. Mal. Iniet. Parssit 1956, 6, 148; 3. DALLDORF, ALBRECHT: Proc. nat. Acad. Sci. 4, 978; 4. DOMOK: Act. Micr. Sci. Hung. 1953, 3, 95; 5. ELIAS și colab.: A doua ses. științ. I.M.F. Buc. 1956, IV, 16, 15; 6. FRANCIS, BROWN, AINSLIE: Am. J. Hyg. 1953, 58, 310; 7. BIELING: Viruskrankheiten, 1, 94; 8. IVANOVICS, PINTER: O. H. 1952, 51, 1452; 9. JOHNSON: A-ch. Vi-us. 1955, 6, 216; 11. JOHNSON, LUNDMARK: Arch. Virus. 1955, 6, 262; 12. IONESCU MIHAIESTI și colab.: Com. Acad. 1954, IV, 9—10, 537; 13. KOEPPE, RHODE: Ztschr. Inn. Med. 1953, 23, 1053; 14. MATTERN DU BUY: Science 1956, 123, 1037; 15. MASTIK, POSPISIL: Exta. Med. 1953, 10; 16. MELNICK, WALTON, MYERS: Publ. Health. Rep. 1953, 58, 1167; 17. PELLEGRINI, CAMPANA: Gtxta. Med. Micro, 1957, 10, 1, 40; 18. SCHWARTZ și colab.: Studii și cerc. infr. 1955, IV, 1—2, 51; 19. SULKIN, WALIS, MURPHY: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1953, 84, 189; 20. VENDEG, ABRAHAM: Rev. Med. 1957, 2, 17; 21. VIVELL, GÄDEKE: Erg. Hyg. 1952, 2, 27, 512; 22. WALTON, MELNICK: Publ. Health. Rep. 1953, 68, 1167.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА КОКСАККИ ПРИ СЛУЧАЯХ ПОЛИОМИЭЛИТА

III. Абрахам, Р. Лернин

Среди 28 клинических случаев полиомиелита у 6-ти больных удалось выявить наличие вируса Коксаки типа „А”. Выделение вируса является возможным из испражнений и спинно-мозговой жидкости. Связь между выделенным вирусом и соответствующей болезнью была доказана положительными реакциями нейтрализации сыворотки больных. Реакции перекрестной нейтрализации дали отрицательные результаты. С целью выявления вируса полиомиелита был использован описанный М. А. Луисом метод с отрицательными результатами.

L'ISOLEMENT DU VIRUS COXSACKIE DANS LES CAS DE POLIOMYÉLITE

Abrahám S., Lőrincz P.

De 28 cas cliniques de poliomyélite on a réussi dans 6 cas à mettre en évidence le virus Cocksackie, de type A. L'isolement du virus est possible des matières fécales et du liquide cephalo-rachidien. Les relations du virus, avec la maladie respective ont été prouvées par les réactions positives de neutralisation avec le sérum des malades. Les réactions de neutralisation croisée ont en des résultats négatifs. Pour la mise en évidence du virus poliomyélique a été utilisée la méthode décrite par M. A. Louis et ses collaborateurs, avec des résultats négatifs.