

Indagini sull'agente eziologico dell'epatite virale umana

Hanno partecipato alle ricerche qui riportate:

- BRENNO BABUDIERI (Laboratori di Microbiologia);
- ENRICO FIASCHI (Istituto di Patologia medica dell'Università di Padova);
- REMO NACCARATO (Istituto di Patologia medica dell'Università di Padova);
- LUDOVICO A. SCURO (Istituto di Patologia medica dell'Università di Padova);
- GENEVÈVE PAPA (Borsista dei Laboratori di Microbiologia);

con l'assistenza tecnica di:

- JUTTA HAASE (Ospite dei Laboratori di Microbiologia);
- FRANCO TANGUCCI (Laboratori di Fisica).

Le ricerche sono state svolte dal 1963 al 1965 presso i Laboratori di Microbiologia ed i Laboratori di Fisica.

PREMESSA

L'epatite virale è certamente una delle malattie infettive che maggiormente hanno attirato in questi ultimi anni l'attenzione del clinico e del virologo. Ciò per tre ragioni principalmente: per la sua frequenza progressivamente crescente, non solo in Italia, ma in quasi tutti i paesi del mondo, per la sua non rara tendenza ad evolvere verso processi cirrotici, evoluzione prima inusuale o per lo meno non riconosciuta, ed infine perchè essa è una delle poche malattie infettive di maggior importanza di cui sia ancora ignoto l'agente eziologico.

Quest'ultima affermazione potrà sorprendere chi, non interessato direttamente a questo argomento, ricordi le frequenti segnalazioni di questi ultimi anni, spesso riecheggiate dalla stampa d'informazione, sull'identificazione o l'isolamento del «vero» virus dell'epatite infettiva. Molti «veri» agenti dell'epatite virale sono stati isolati, ma purtroppo, pur avendo ciascuno di essi argomenti validi in proprio favore, essi sono, per caratteri fondamentali, ciascuno diverso dall'altro. Nelle due riunioni che il Comitato degli esperti dell'epatite virale dell'OMS ha tenuto, nel 1963 a Ginevra e nel 1964 a Praga, tutti questi reperti sono stati criticamente considerati e per nessuno di essi si è ritenuto che le prove addotte fossero sufficienti per considerare

risolto il problema eziologico dell'epatite virale. Ciò vale anche per il virus, il cosiddetto « Hemovirus », isolato da RIGHTSEL *et al.* (1-3) nei laboratori della Parke e Davis, studiato con grandi mezzi e considerato per alcuni anni come il candidato provvisto di maggiori titoli. Ad alcune perplessità riguardanti alcune tecniche seguite da quei ricercatori e certi risultati da essi ottenuti, si è aggiunto di recente il peso negativo della mancata conferma da parte di altri laboratori che hanno voluto ripetere tali prove.

Non è nostro intendimento enumerare qui i vari reperti virologici esistenti nella letteratura; rinviando per questo alla bella rassegna fatta da DARDANONI (4) al congresso della Società italiana d'igiene, tenuto a Catania nell'autunno del 1963. Dopo tale data qualche altro reperto s'è aggiunto, come quello di LIEBHABER *et al.* (5) negli Stati Uniti, di BUCHNER e SHREEVE (6) nel Canada, di CASSEL (7) in Germania. Si tratta in genere di effetti citopatici ottenuti inoculando in colture cellulari estratti ottenuti da feci, urine o, in un caso, dal siero di pazienti. CASSEL invece ha ripreso precedenti ricerche attribuendo significato virale ad alcuni elementi che aveva già precedentemente descritto.

Gli studi sulle lesioni subcellulari che l'epatite virale umana determina nell'epatocita sono poco numerosi. Ricordiamo le osservazioni di BRAUNSTEINER *et al.* (8), di CASSEL (7, 9), di BEARCROFT *et al.* (10, 11), di TAYLOR *et al.* (3), tra di loro in complesso concordanti. Le lesioni più evidenti sono a carico dei mitocondri, che appaiono rigonfiati e con le cristae ridotte o frammentate. I vacuoli del reticolo citoplasmatico sono ipertrofici e si nota un aumento spesso considerevole, nel reticolo, dei granuli di Palade. Le aree ergastoplasmatiche sono di solito ridotte e male delimitabili. Il nucleo appare scarsamente interessato dall'infezione.

Gli scopi che ci siamo proposti nelle nostre ricerche sono stati due: studiare al microscopio elettronico le lesioni dell'epatocita in corso di epatite virale e identificare nelle cellule epatiche l'ancora ignoto virus responsabile dell'infezione.

PRELEVAMENTO E PREPARAZIONE DELLE BIOPSIE

I pazienti da noi presi in considerazione provengono tutti da episodi epidemici di epatite virale, manifestatisi sia in Sardegna che nel Veneto. Non abbiamo preso in considerazione soggetti ammalatisi all'infuori delle zone epidemiche, i quali avrebbero potuto offrire qualche dubbio diagnostico. La diagnosi è stata posta in base a criteri clinici, biochimici (transaminasi, prove di funzionalità epatica e di labilità serica) e, almeno in parte, sierologici (reazione di Hoyt-Morrison).

Il materiale di studio è stato prelevato mediante biopsia epatica praticata con l'ago di Silvermann. Il frammento destinato all'esame ultramicro-

scopico è stato immediatamente fissato con acido osmico all'1% in tampone di Michaelis a $\text{pH} = 7,2$, passato nella serie degli alcool-acetone e successivamente incluso in metacrilato o in araldite. Le inclusioni sono state sezionate con un ultramicrotomo Porter-Blum ed osservate con il microscopio elettronico Siemens Elmiskop I. Raramente le sezioni sono state osservate senza trattamento; più spesso sono state colorate con acetato d'uranile o con Karnowski.

Altri frammenti di tessuto sono stati osservati con il microscopio ottico, impiegando le abituali tecniche istologiche o sono stati sottoposti all'osservazione al microscopio a fluorescenza dopo trattamento con acridin-orange o con gamma-globuline di convalescente coniugate con l'isotiocianato di fluoresceina.

Come controlli sono stati studiati frammenti biotici tratti da fegati di soggetti affetti da malattie diverse dall'epatite virale.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

Il nucleo della cellula epiteliale epatica non viene particolarmente alterato dall'infezione. Esso è ricco di cromatina come di norma e questa è uniformemente distribuita in esso. Contrariamente all'opinione di BEARCROFT⁽¹⁰⁾, non riteniamo che questa distribuzione uniforme sia caratteristica dell'epatite virale. Abbiamo osservato aspetti perfettamente uguali anche in nuclei di cellule epatiche di controllo.

Nei casi non gravi di epatite virale le lesioni submicroscopiche del citoplasma della cellula epatica non sono molto considerevoli. L'alterazione più evidente consiste in un rigonfiamento dei canalicoli costituenti il reticolo citoplasmatico (Fig. 1). Alle volte su sezioni trasverse essi appaiono come vacuoli vuoti.

Il numero dei mitocondri appare modicamente aumentato ed essi si presentano rigonfi e rotondeggianti. Le cristae sono diminuite di numero e spesso frammentate. Essi contengono uno scarso numero di granuli opachi, presenti del resto anche in cellule normali (Fig. 2).

Nel citoplasma si osservano alcune inclusioni di notevole opacità, probabilmente costituite da lipidi. Esse sono di dimensioni notevolmente maggiori di quelle presenti negli epatociti normali e talvolta comprendono nella loro struttura un certo numero di vacuoli vuoti (Fig. 3).

I lisosomi sono piuttosto numerosi e raggiungono spesso dimensioni maggiori che nella cellula normale. Alcuni lisosomi alterati contengono al loro centro un materiale di notevole opacità, di probabile natura lipidica, circondato da una zona trasparente che è probabilmente da considerarsi un artefatto dovuto al trattamento subito dai tessuti con l'acetone (Fig. 4). Altri lisosomi contengono invece ammassi di ferritina intensamente opachi,

e questi non differiscono in maniera apprezzabile da quelli, simili, presenti anche in cellule normali.

Nel citoplasma si possono osservare anche alcuni vacuoli dovuti a fenomeni di autolisi. Essi contengono abitualmente una piccola porzione di citoplasma più o meno alterato, racchiuso da una membrana. Con notevole frequenza questi frammenti sono stipati di ribosomi (Fig. 5). Alle volte nel vacuolo è contenuto anche un intero mitocondrio, in cui i processi litici sono appena all'inizio (Fig. 6).

I microsomi non mostrano particolari alterazioni. Le zone contenenti glicogeno hanno un aspetto normale ma sono ridotte di numero e di estensione.

Nel citoplasma si possono inoltre osservare granuli di ferritina, sia isolati che raccolti in piccoli ammassi, all'infuori dei lisosomi. In alcune sezioni sono state viste inclusioni costituite da lamelle concentriche mielinosimili. Esse sono probabilmente formate da colesterolo.

Accanto a queste strutture più o meno alterate, ma agevolmente riferibili a componenti citoplasmatici noti, abbiamo osservato alcune formazioni che altri AA. hanno creduto di poter riferire al ricercato agente dell'epatite infettiva. Abbiamo così osservato con una certa frequenza le formazioni a rosetta descritte da BEARCROFT (10). Formazioni del tutto simili sono state da noi trovate anche in cellule normali. Le riteniamo dovute generalmente a piccoli ammassi di granuli di glicogeno o, alle volte li identifichiamo con polisomi, costituiti dall'aggregazione di un certo numero di ribosomi.

Abbiamo pure osservato, non raramente, in cellule lese, corpiccioli con un diametro di 420-2500 Å, circondati da una membrana singola o doppia, intensamente opaca (Fig. 8). Essi mostrano al centro un granulo opaco. Queste formazioni corrispondono rispettivamente ai corpiccioli piccoli ed a quelli grandi descritti da BRAUNSTEINER *et al.* (8) e da CASSEL (7,9), e considerati come possibili elementi virali. In effetti essi ricordano notevolmente l'aspetto di alcuni virus di grosse o medie dimensioni e soprattutto quello dell'esantema coitale vescicolare dei bovini, descritto recentemente da SCHULZE *et al.* (12). Queste formazioni, a nostro parere, non hanno nulla a che vedere con il virus dell'epatite infettiva, perchè, a parte altre considerazioni, il loro diametro è notevolmente maggiore di quello che il virus dell'epatite deve avere in base alle prove di filtrazione eseguite da MC COLLUM (13) attraverso membrane graduate e successiva inoculazione del filtrato a volontari umani.

Del resto già nel 1958 DE HARVEN e FRIEND (14) hanno descritto, quali artefatti, in cellule epatiche normali, formazioni alquanto simili a queste sopradescritte.

Un aspetto morfologico molto caratteristico della cellula epatica in corso di epatite virale, e che potrebbe anche avere un certo riferimento con il virus della malattia, è quello che riguarda i ribosomi. Già altri AA.

e fra questi specialmente BEARCROFT e PEACHEY⁽¹¹⁾ avevano notato che nel citoplasma degli epatociti in corso di epatite virale c'è un forte aumento di RNA. Poichè lo RNA aumenta anche in casi di intossicazione non eccessivamente grave da veleni epatotropi, qualcuno ha ritenuto che questo aumento potesse essere messo in rapporto con un aumentato passaggio nel citoplasma di RNA messaggero, in rapporto ai processi di sintesi proteica connessa a fenomeni rigenerativi della cellula danneggiata.

Noi abbiamo potuto confermare questo aumento dello RNA citoplasmatico colorando le cellule epatiche infette con acridin-orange dopo fissazione con Carnoy. Abbiamo anche potuto constatare, e credo che questa sia una osservazione originale, che nell'epatite virale le cellule epatiche colorate semplicemente con ematossilina Carazzi ed eosina, mostrano il loro citoplasma come velato da una granulosità basofila uniformemente diffusa ed estremamente fine. È possibile che essa sia dovuta allo RNA diffuso nel citoplasma.

Pur non potendosi escludere questo presunto aumento dello RNA messaggero, si deve ritenere che l'aumento dello RNA citoplasmatico sia essenzialmente legato ad un notevole aumento dei granuli di Palade. Questi spiccano con maggior nitidezza che di norma, caratteristica questa rilevata anche da TAYLOR *et al.*⁽³⁾, ed accanto a quelli ordinati come di norma lungo le pareti dei canalicoli del reticolo o aderenti ai sacchi membranosi piatti del citoplasma, se ne osservano altri che formano piccoli aggregati nel citoplasma o che in certe zone si dispongono ordinatamente in più file parallele, con regolari intervalli tra i singoli granuli, sì da assumere alle volte una struttura similcristallina che richiama strutture intracellulari similari caratteristiche di certi virus (Fig. 7).

Questo notevole e caratteristico aumento dei ribosomi ed il loro peculiare ordinamento in certe zone del citoplasma ci portano all'ipotesi che essi possano avere rapporto con la sintesi del virus.

Desideriamo infine descrivere un altro tipo di formazioni che riteniamo, sia pure con le debite riserve, di poter identificare con il virus ricercato (Figg. 9, 10, 11, 13).

Queste formazioni sono state da noi ritrovate in 6 soggetti, su puntati epatici praticati da un minimo di 9 ad un massimo di 33 giorni dall'inizio clinico della malattia.

Si tratta di formazioni granulari, rotondeggianti, con un diametro che s'aggira intorno ai 200 Å. Ricordiamo che MC COLLUM⁽¹³⁾ ha valutato con prove di filtrazione, che il virus dell'epatite B deve misurare circa 260 Å di diametro. Qualora si tenga presente che nei processi di disidratazione conseguenti alla fissazione e nell'inclusione del preparato per l'osservazione al microscopio elettronico, le particelle virali subiscono una riduzione del loro diametro che arriva fino al 20 %, si constata che le nostre formazioni granulari misurano esattamente quanto teoricamente ci si doveva attendere.

Questi granuli, in qualche caso notevolmente e irregolarmente addensati, ma più spesso relativamente dispersi, occupano uno spazio citoplasmatico rotondeggiante od ovalare, scarsamente opaco ai raggi elettronici, del diametro di 0,3-1 μ , racchiuso da una membrana semplice, simile a quella che delimita abitualmente i vacuoli citoplasmatici. La massima parte dei presunti elementi virali si trova racchiusa in questi sacculi, ma uno scarso numero di essi si trova irregolarmente disseminato nel citoplasma circostante. In un caso abbiamo osservato quello che potrebbe forse essere considerato come lo stadio iniziale di formazione di un ammasso virale. Si tratta di un'area citoplasmatica simile a quelle sopra descritte, delimitata da una membrana non bene definita in tutta la sua estensione, opaca e piuttosto omogenea d'aspetto. Però alle due estremità di tale spazio si osservano due vacuoli, non circondati da membrana, chiari e contenenti un certo numero di granuli con le caratteristiche di quelli sopra descritti (Fig. 12).

Questi sacculi contenenti granuli da noi osservati, sono molto simili alle immagini descritte recentemente da RICHTER *et al.* (15) negli epatociti dell'anatra affetta da epatite virale, e considerate come ammassi del virus responsabile di quella infezione (Fig. 14).

I granuli da noi descritti si distinguono agevolmente dai ribosomi, sia per le loro dimensioni lievemente superiori, sia perchè non mostrano un ordinamento regolare in linee, sia perchè sono contenuti in sacculi delimitati da una membrana. Inoltre essi sono chiaramente rotondeggianti, mentre i ribosomi assumono spesso una forma triangolare molto caratteristica.

Anche una confusione con granuli di glicogeno è facilmente evitabile. Ad ogni modo, per maggior sicurezza, abbiamo fatto ricorso sia al trattamento delle sezioni con l'acetato d'uranile che, com'è noto, differenzia nettamente il glicogeno dagli acidi nucleici, sia al trattamento dei tessuti con diastasi. Questa, che dissolve il glicogeno, non intacca invece i granuli da noi descritti.

Non abbiamo mai osservato formazioni di questo genere in cellule epatiche di controllo, prelevate a pazienti affetti da altre malattie.

Le formazioni da noi descritte sono generalmente situate negli epatociti, ma la presenza, in qualche caso, nelle cellule infette, di numerose fini fibrille, fa ritenere che esse possano essere situate anche in elementi di natura istiocitaria, forse in cellule di Kupffer.

RICERCHE CON IL METODO DELLA IMMUNOFLUORESCENZA

Per accertare se questo presunto virus abbia caratteristiche antigeniche riferibili a quelle che dovrebbero essere proprie del virus dell'epatite infettiva, abbiamo fatto ricorso alla tecnica dell'immunofluorescenza. A questo scopo abbiamo estratto le gamma-globuline dal siero di alcuni soggetti convales-

scenti di epatite virale tipica, con reazione di Hoyt-Morrison nettamente positiva. Le gamma-globuline sono state coniugate con isotiocianato di fluoresceina e, previo adsorbimento con polvere di fegato umano normale, esse sono state messe a contatto, sia con sezioni, sia con preparati per impronta di frammenti epatici prelevati per biopsia da quei pazienti in cui avevamo visto al microscopio elettronico il presunto virus. Abbiamo così ottenuto delle aree di fluorescenza intracellulare, aree che molto spesso risultano costituite da un insieme di piccoli spazi rotondeggianti, che potrebbero corrispondere ai sacculi da noi osservati al microscopio elettronico. (Figg. 15 e 16)

TENTATIVI DI COLTIVAZIONE DEL VIRUS IN COLTURE DI CELLULE

Il passo successivo al quale ci siamo accinti è stato quello di tentare la coltivazione del virus su colture cellulari. Questi tentativi sono ancora in corso e non ci hanno dato finora risultati definitivi. Gli stipiti cellulari impiegati per questo scopo sono stati soprattutto quelli HeLa, KB e lo stipite RC, gentilmente fornitoci dal Prof. Rita. Questo ceppo, le cui cellule sopravvivono in coltura per molti giorni, è quello che ci ha dato i risultati più incoraggianti.

Premettiamo che in nessun caso abbiamo osservato un effetto citopatogeno, ma a questo risultato negativo non abbiamo dato eccessiva importanza perchè, a parte la dimostrata possibilità che un virus si sviluppi in cellule senza portarle alla degenerazione, ci siamo prospettati la possibilità che il virus dell'epatite virale, in considerazione anche del lungo periodo d'incubazione caratteristico di questa malattia, si sviluppi molto lentamente nelle cellule, sì che l'eventuale effetto citopatogeno potrebbe anche coincidere con i fatti degenerativi che normalmente si manifestano nelle colture cellulari eccessivamente invecchiate. Non volendo ricorrere, per ragioni etiche, all'impiego dei cosiddetti « volontari umani » e non potendo utilizzare, per la loro non ricettività, gli animali di laboratorio, abbiamo fatto ricorso, anche in questo caso alla tecnica dell'immunofluorescenza. Diciamo brevemente che siamo riusciti ad identificare zone di fluorescenza anche in colture al 2° o 4° passaggio. Queste compaiono in genere verso la 15ª giornata e raggiungono il massimo verso la 20ª-25ª. Devo dire però che in qualche caso abbiamo avuto fluorescenza anche con l'impiego di gamma-globuline provenienti da un siero di soggetto presumibilmente sano.

A questo riguardo, data la grande diffusione delle forme clinicamente mute dell'epatite virale, occorre osservare che è molto difficile poter essere certi che un siero prelevato ad un soggetto ritenuto sano non contenga anticorpi per il virus epatitico. Ricordiamo a questo riguardo le recenti indagini di SPONG (16) che trovò valori di transaminasi superiori alla norma nel

76% di 737 soggetti apparentemente sani, che avevano vissuto in un ambiente dove c'erano stati casi di epatite virale.

Ad ogni modo queste nostre ricerche culturali, anche se incoraggianti, sono incomplete e non possono essere assolutamente considerate probative. Esse debbono essere proseguite perchè solo un risultato sicuramente positivo in questo campo ci potrebbe aprire la strada allo studio delle caratteristiche biologiche del virus, primo passo verso ricerche indirizzate a trovare armi terapeutiche e profilattiche contro una malattia la cui importanza pratica va di giorno in giorno aumentando.

Esprimiamo la nostra più viva riconoscenza alla Prof. D. Steve Bocciarelli per i consigli datici nel corso delle nostre ricerche.

Riassunto. — Le lesioni submicroscopiche della cellula epatica in corso di epatite virale consistono in un rigonfiamento dei mitocondri ed in una frammentazione e diminuzione delle loro cristae, in una dilatazione dei canalicoli del reticolo citoplasmatico, in una ipertrofia dei lisosomi contenenti pigmenti lipidici ed in un forte aumento del numero dei ribosomi, che invadono alcune zone citoplasmatiche disponendosi su più file parallele.

Nel citoplasma delle cellule infette vengono descritti ammassi di granuli di 200 Å di diametro, racchiusi in sacculi ovalari circondati da una membrana semplice. Gli AA. ritengono che questi granuli possano corrispondere all'agente dell'epatite virale.

Vengono descritti i risultati di prove di immunofluorescenza e dei primi tentativi di cultura del presunto virus su cellule.

Summary. — The most evident lesions of the human epithelial liver cell, in viral hepatitis, consist in an enlargement of the canalicula of the endoplasmic reticulum and in an increase of the size and, perhaps, of the number of the mitochondria, which contain only some scarce and fragmented «cristae».

Characteristic of the liver cell in the course of viral hepatitis is also the large amount of ribosomes, which constitute many clusters or are ordered in more parallel lines, with a regular interval between the granules.

In many patients the AA. have observed some cytoplasmatic «sacula», bordered by a simple membrane, containing round virus-like particles, with a diameter of about 200 Å.

These «sacula» correspond, in size and aspect, to some fluorescent areas observed after treatment of human infected liver cells with γ -globulins of convalescents from viral hepatitis, conjugated with fluorescein isothiocyanate.

The AA. believe that these bodies could correspond to the agent of the human viral hepatitis.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) RIGHTSEL, W. A., R. A. KELTSCH, F. M. TEKUSHAN e I. W. MC LEAN, Jr. - *Science*, **124**, 226 (1956).
- (²) RIGHTSEL, W. A., R. A. KELTSCH, A. R. TAYLOR, J. D. BOGGS e I. W. MC LEAN, Jr. - *J. Am. Med. Assoc.*, **177**, 671 (1961).
- (³) TAYLOR, A. R., W. A. RIGHTSEL, R. A. KELTSCH e M. H. JONES. - *J. Appl. Physiol.*, **32**, 1635 (1961).
- (⁴) DARDANONI, L. - *Atti XXIII Congr. Nazl. Igiene*, Catania, 1963.
- (⁵) LIEBHABER, H., S. KRUGMAN, J. P. GILES e D. M. MC GREGOR. - *Virology*, **24**, 109 (1964).
- (⁶) BUCHNER, B. K. e M. SHREEVE. - *Can. J. Public. Health*, **55**, 299 (1964).
- (⁷) CASSEL, L. - *Klin. Wochschr.*, **37**, 1263 (1959).
- (⁸) BRAUNSTEINER, H., K. FELLINGER, F. PAKESCH e A. NEUMAYR. - *Klin. Wochschr.*, **36**, 379 (1958).
- (⁹) CASSEL, L. - *Acta Hepato-Splenol.*, **8**, 333 (1961).
- (¹⁰) BEARCROFT, W. G. C. - *J. Pathol. Bacteriol.*, **83**, 383 (1962).
- (¹¹) BEARCROFT, W. G. C. e R. D. G. PEACHEY. - *J. Pathol. Bacteriol.*, **83**, 373 (1962).
- (¹²) SCHULZE, P., E. HAHNEFELD e H. HAHNEFELD. - *Arch. Exptl. Veterinärmed.*, **16**, 375 (1962).
- (¹³) MC COLLUM, R. W. - *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **81**, 157 (1952).
- (¹⁴) DE HARVEN, E. e C. FRIEND. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 151 (1958).
- (¹⁵) RICHTER, W. R., E. J. RDZOK e S. M. MOIZE. - *Virology*, **24**, 114 (1964).
- (¹⁶) SPONG, F. W. - *Med. News*, **190**, 35 (1965).

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

1. — Rigonfiamento dei canalicoli del reticolo citoplasmatico. Ipertrofia dei mitocondri e frammentazione delle « cristae ».
2. — Rigonfiamento dei mitocondri e frammentazione delle « cristae ».
3. — Inclusioni citoplasmatiche costituite presumibilmente da lipidi.
4. — Lisosomi alterati contenenti pigmento.
5. — Fenomeni di autolisi di porzioni citoplasmatiche stipate di ribosomi.
6. — Vacuolo da citolisi contenente un mitocondrio.
7. — Aumento numerico dei ribosomi e loro disposizione in file parallele.
8. — Formazioni pseudovirali.
- 9, 10, 11. — Sacculi contenenti elementi virus-simili.
12. — Possibile stadio iniziale di un sacculo in una cellula di natura istiocitaria.
13. — Sacculi contenenti elementi virus-simili.
14. — Virus dell'epatite dell'anatra [da Richter *et al.* (15)].
15. — Striscio di puntato epatico di paziente 1.300 x. Fissazione con acetone.
16. — Sezione di puntato epatico di paziente 1.300 x. Fissazione con Bouin.

Le Figg. 1-13 riguardano cellule epatiche di pazienti affetti da epatite virale (complessivamente 8 soggetti).

Le sezioni di cui alle Figg. 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 sono state colorate con Karnowski. I preparati delle Figg. 15 e 16 sono stati trattati con γ -globuline coniugate con isotiocianato di fluoresceina, colorate per contrasto con Evans blu. Si notino le piccole aree circolari di fluorescenza, probabilmente corrispondenti ai « sacculi ».

EPATITE VIRALE

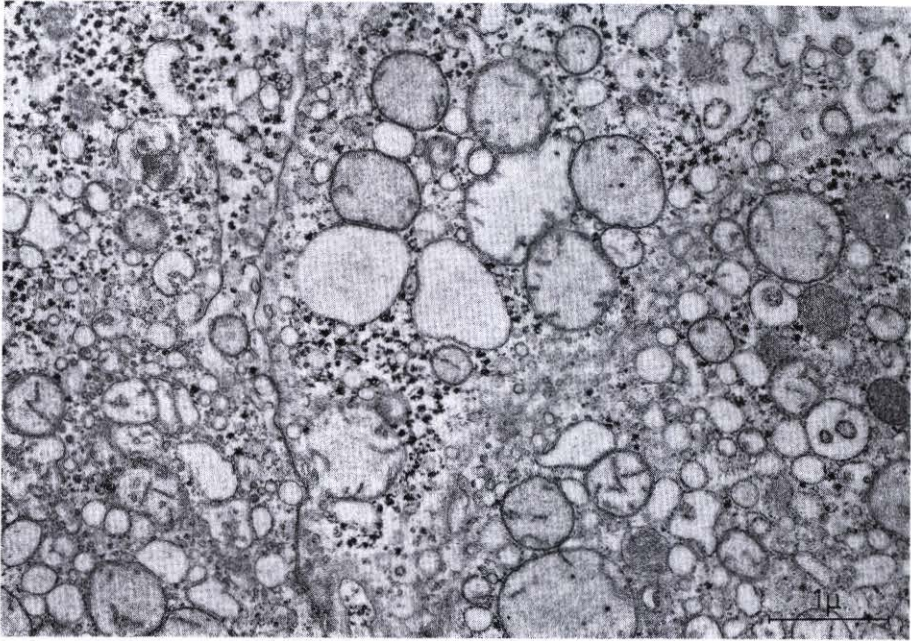


Fig. 1.

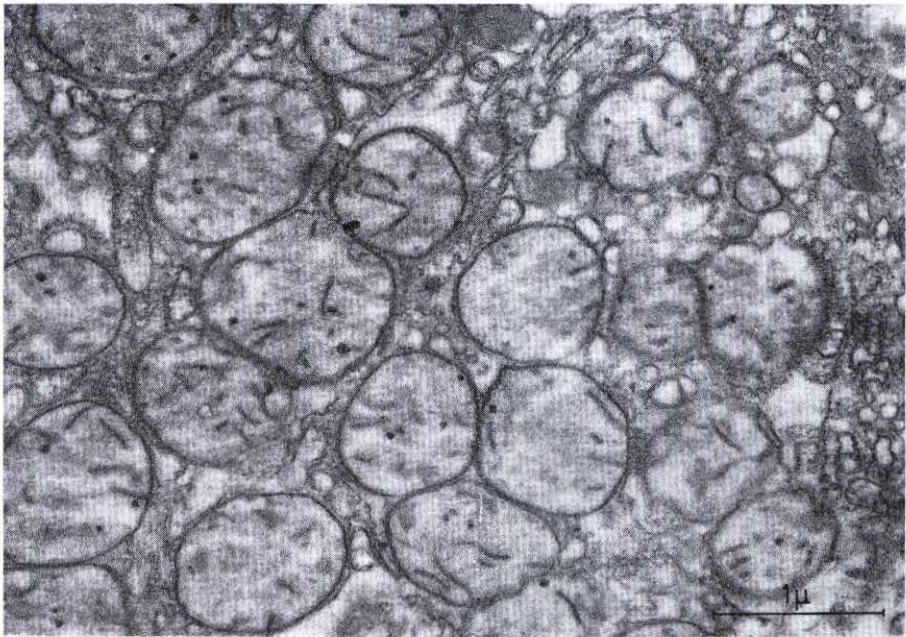


Fig. 2.

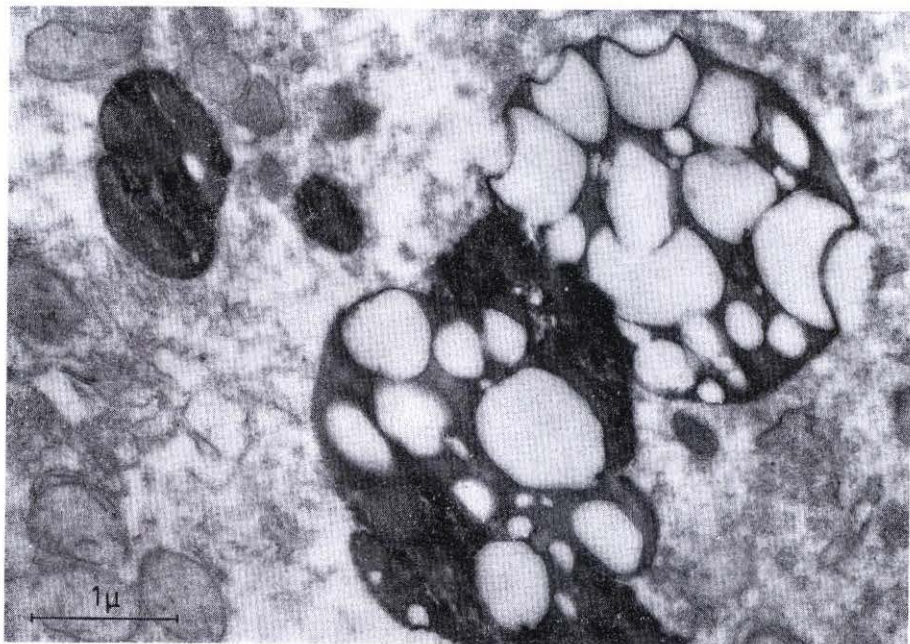


Fig. 3.

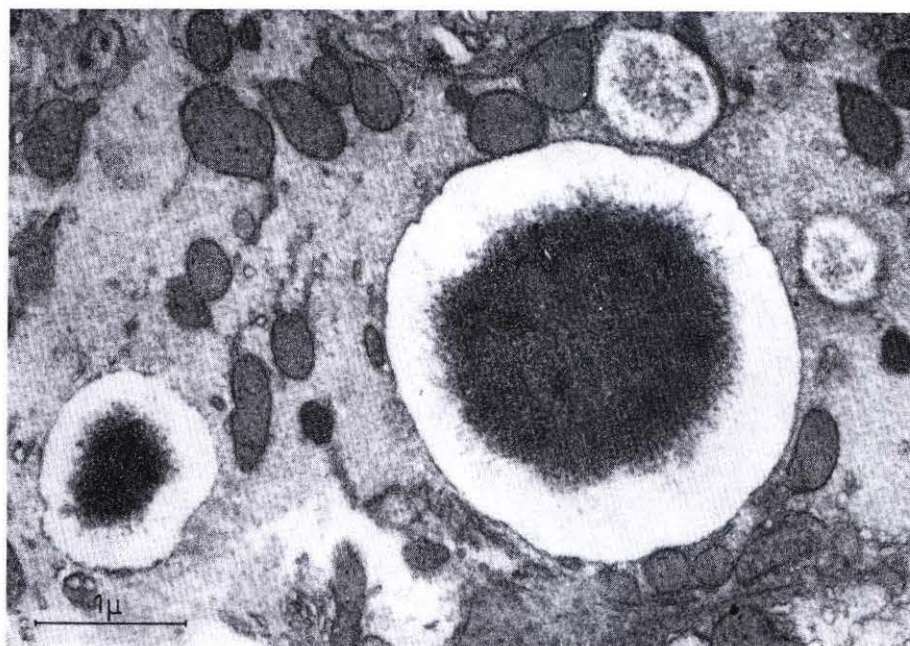


Fig. 4.

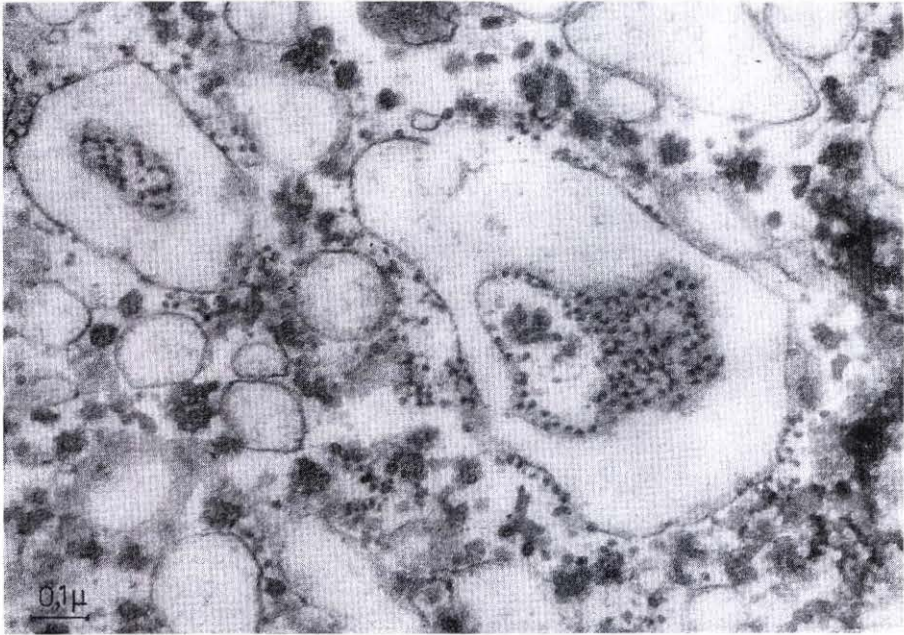


Fig. 5.

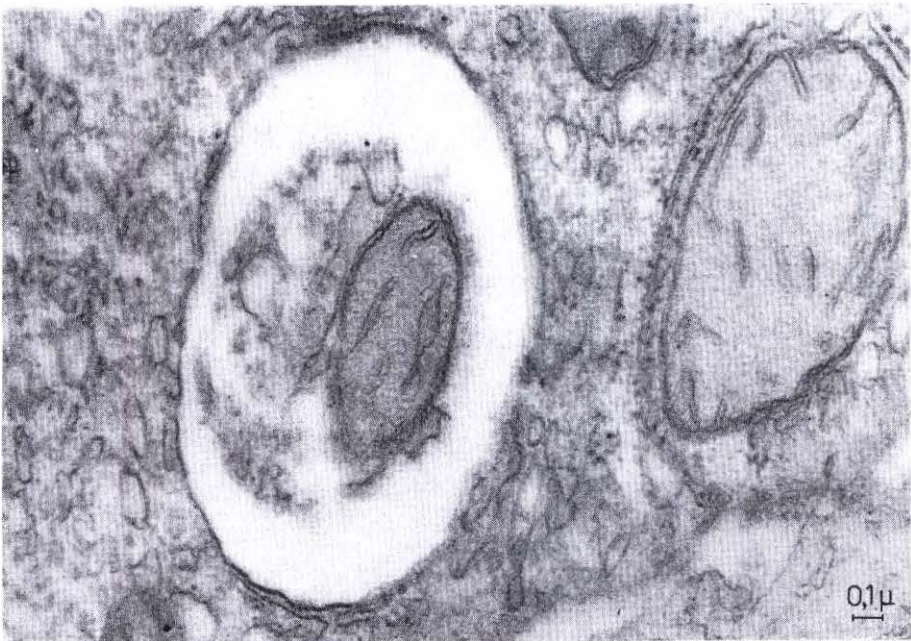


Fig. 6.

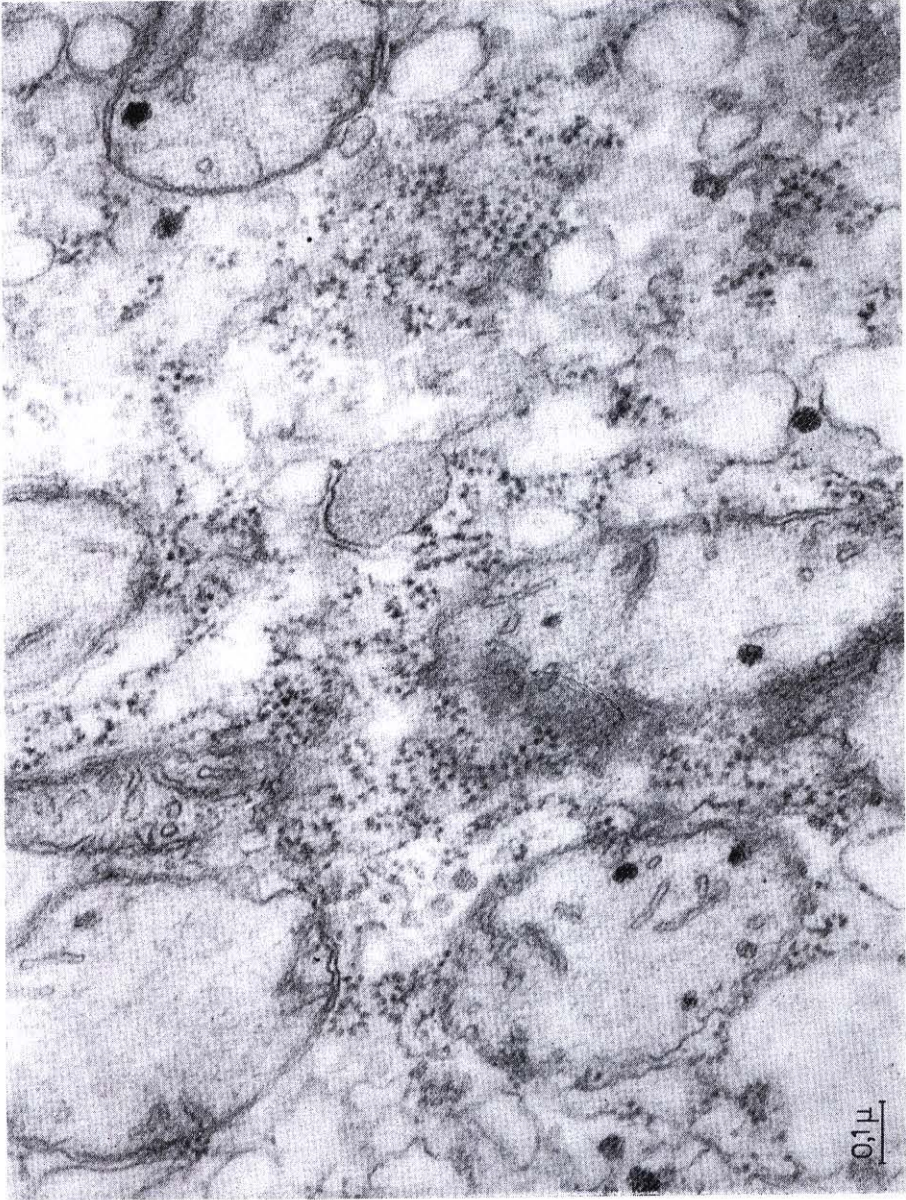


Fig. 7.

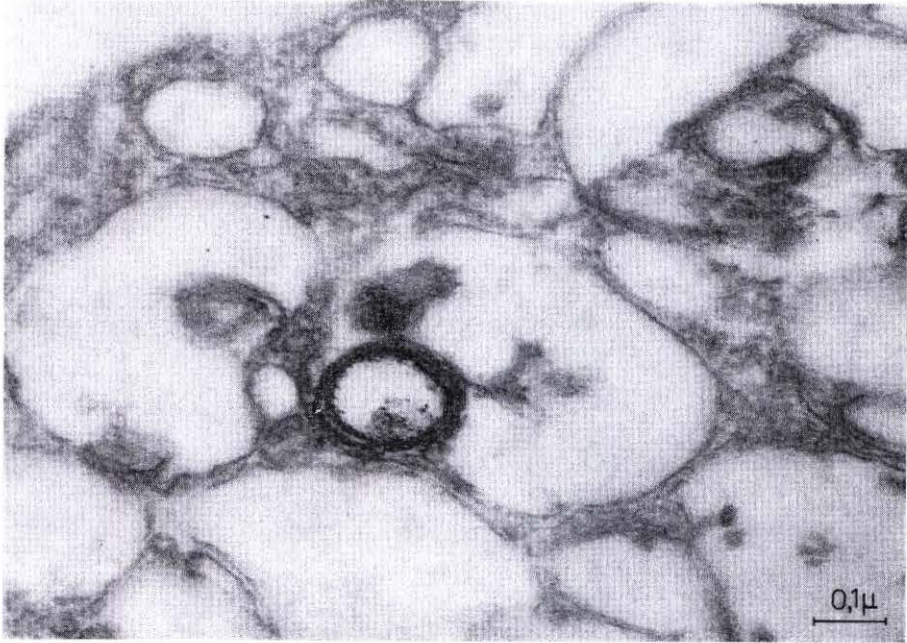


Fig. 8.

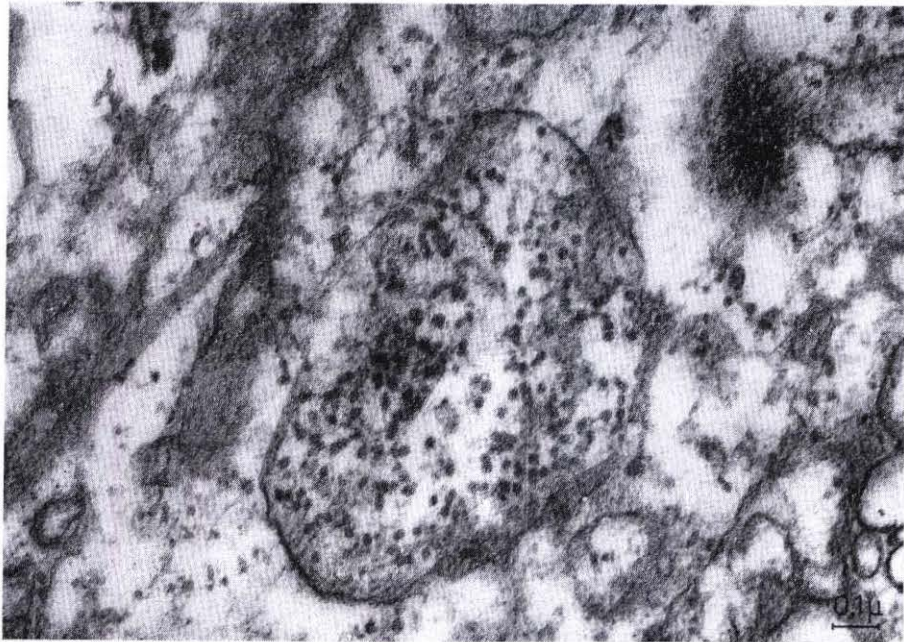


Fig. 9.



Fig. 10.

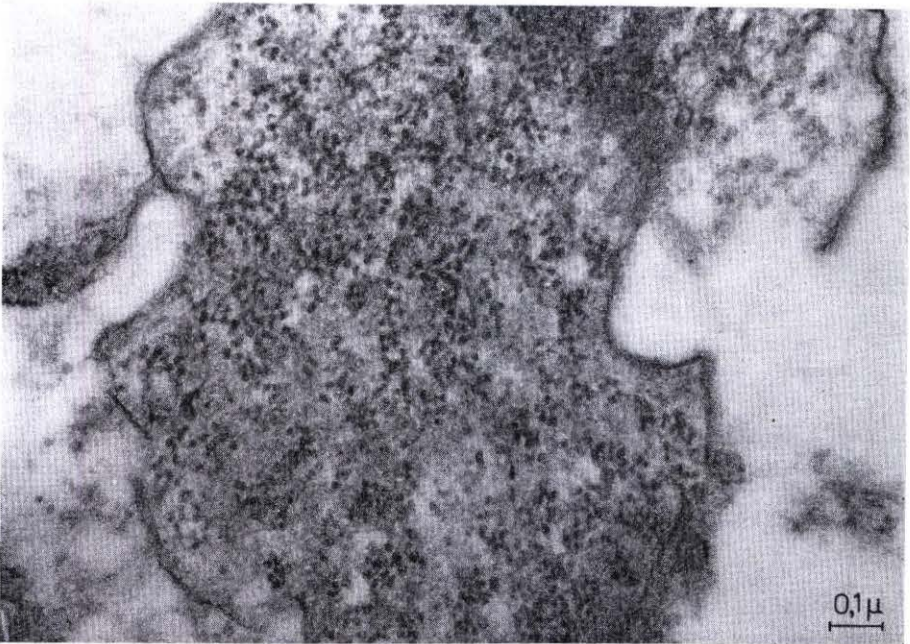


Fig. 11.

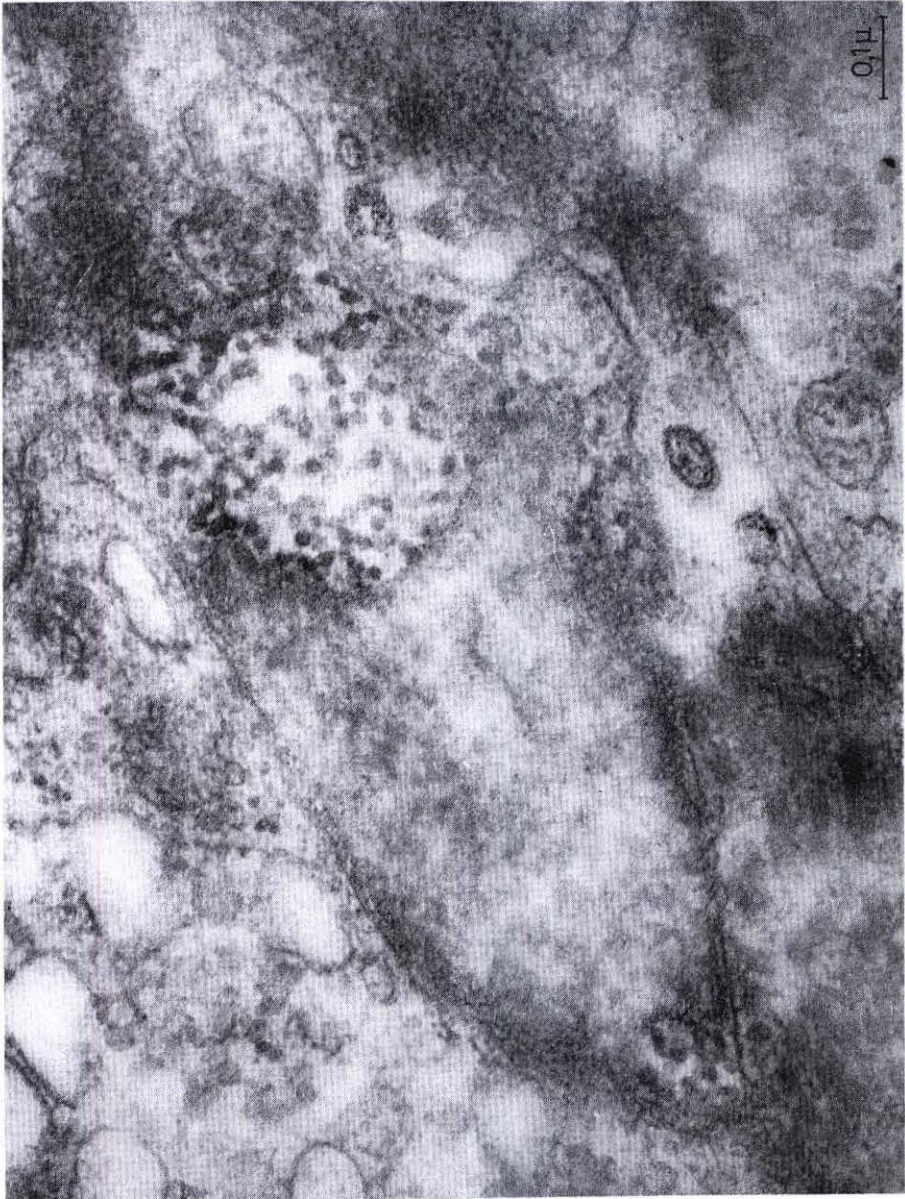


Fig. 12.

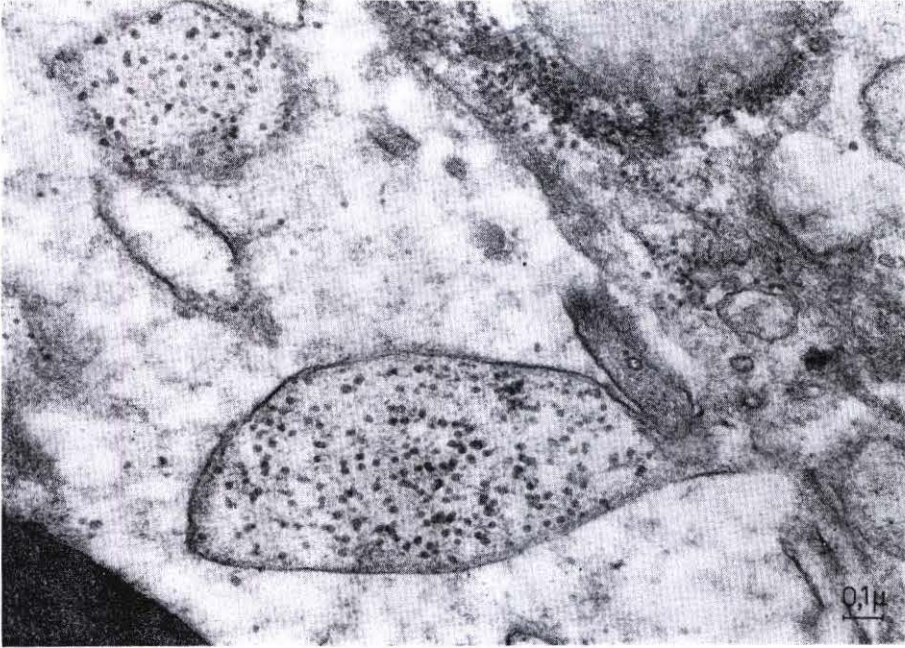


Fig. 13.

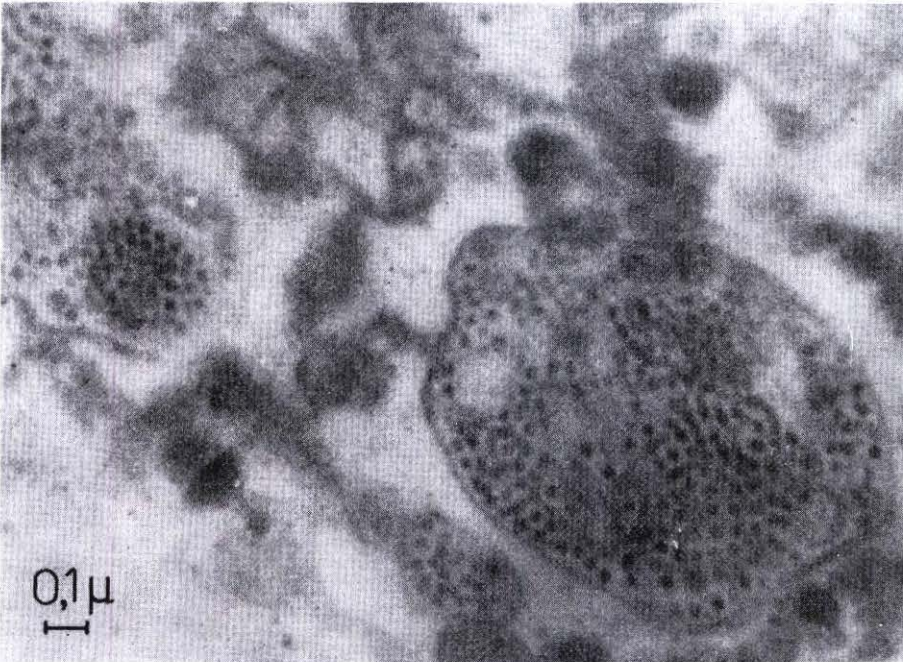


Fig. 14.



Fig. 15.

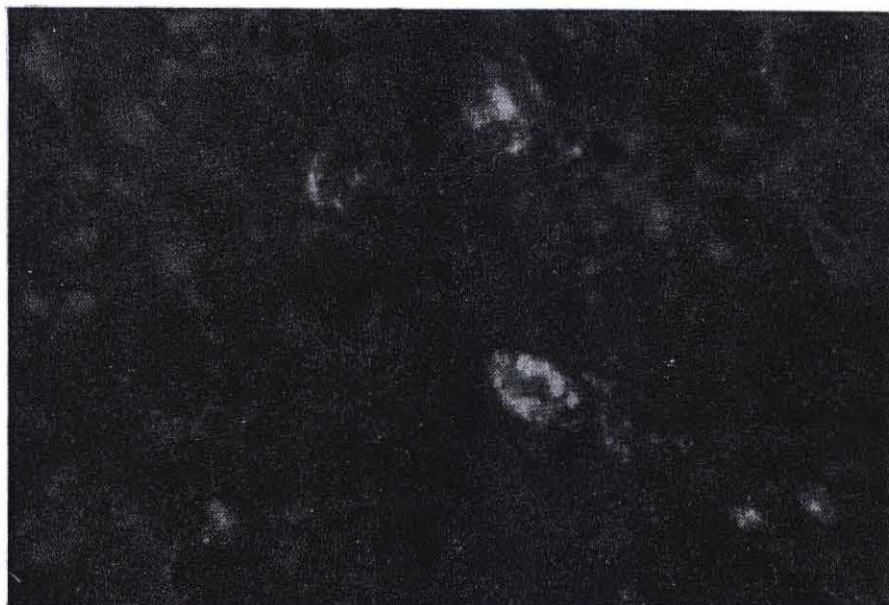


Fig. 16.