

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVI, 1

SECTIO C

1971

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zbigniew KAWECKI, Aleksandra MELKE

Dynamika replikacji wirusa krowianki w zależności od temperatury inkubacji

Динамика репликации вируса вакцины в зависимости от температуры инкубации

Dynamics of the Replication of Vaccinia Virus in Relation to Incubation Temperature

Zagadnieniem wciąż jeszcze nie wyjaśnionym pozostaje sprawa pokrewieństwa wirusów należących do grupy pokswirusów, a szczególnie zagadnienie pochodzenia wirusa krowianki, używanego obecnie do szczepień. Fakt, że nie udało się w warunkach laboratoryjnych przemiana wirusa ospy prawdziwej w wirusa krowianki, nie świadczy o tym, że wirusy te mają różne pochodzenie i istnieją w przyrodzie niezależnie od siebie (5).

Kwestia związku wirusa krowianki z wirusem ospy ludzkiej i wirusem ospy bydła w dalszym ciągu jest przedmiotem wielu dociekań. Nie wiadomo, co stało się z oryginalnym wirusem Jennera przy przeniesieniu materiału szczepionkowego z ramienia na ramię osób uodpornionych w środowisku, w którym było jeszcze wówczas bardzo wiele przypadków ospy naturalnej.

Burnet (1) sugeruje nieświadomą selekcję jakiejś łagodnej odmiany wirusa ospy ludzkiej i ta odmiana zostałaby następnie ustabilizowana na cielecach jako skórny szczep krowianki. Na dowód słuszności swoich dociekań przytacza badania Dawniego, z których wynika, że serologicznie wirus krowianki jest bliższy ospie ludzkiej niż ospie krów. Jeżeli założenie Burneta jest słuszne, to wirus krowianki pochodziłby od jakiegoś mało zjadliwego szczepu wirusa ospy ludzkiej, a więc prawdopodobnie od jakiegoś szczepu *variola minor*. Czy tak jest, postanowiono sprawdzić w przeprowadzonych badaniach, śledząc równocześnie dynamikę procesu namnażania wirusa krowianki w różnych temperaturach inkubacji.

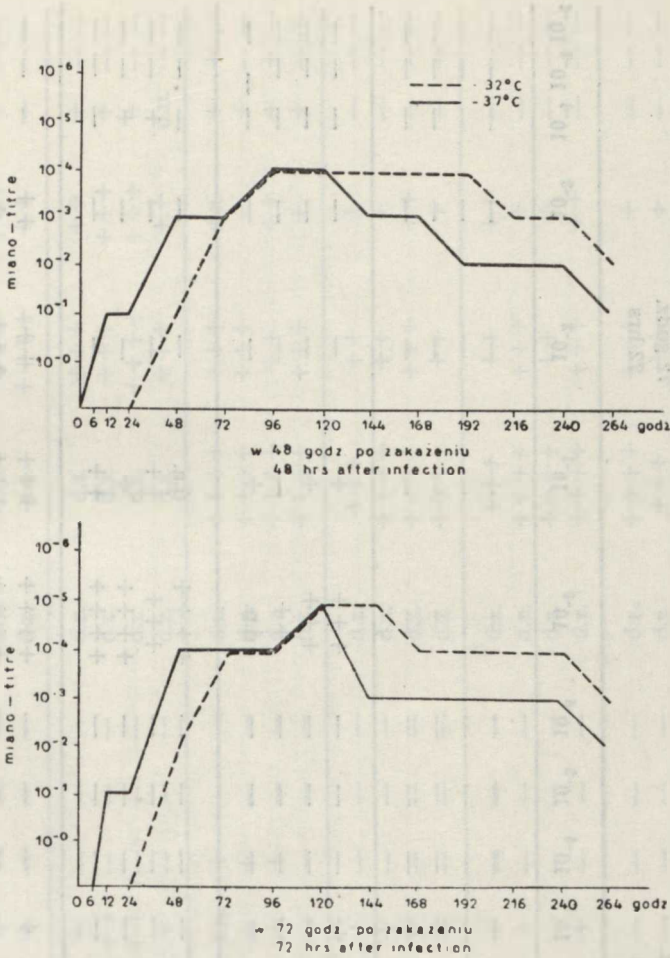
MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na linii ciągłej komórek FL. Tkanekę hodowano w płynie Sywertona i Scherera w modyfikacji stosowanej w pracowni wirusologicznej (2). Do badań użyto wirusa krowianki, otrzymanego w postaci szczepionki z Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Lublinie. Przed rozpoczęciem badań wykonano 5 kolejnych pasażów wirusa krowianki w komórkach FL, a następnie przepasażowano na zarodek kurzy w celu stwierdzenia, czy ma on zdolność wywoływania typowych zmian na błonie kosmówkowo-omoczniowej. Po określeniu miana wirusa krowianki na komórkach FL, badany szczep wirusa zamrożono. W ten sposób przygotowany wirus stanowił szczep wyjściowy do badań. Po zakończeniu doświadczeń, miano wirusa ponownie sprawdzano. Stwierdzono, że miano początkowe i końcowe wirusa krowianki było identyczne i wynosiło 10^{-5} . Dawką 0,1 ml nie rozcieńczonego szczepu wirusa krowianki zakażono 30 probówek z 3-dniową hodowlą komórek FL. Probówki zakażono przez 2-godzinny kontakt wirusa z komórkami, następnie hodowlę przepłukiwano w celu usunięcia nie zaabsorbowanych cząstek wirusa i wprowadzono płyn utrzymujący. Połowę zakażonych probówek inkubowano w temp. 37°C , a połowę w temp. 32°C . Dla stwierdzenia obecności namnażającego się wirusa w płynie po upływie 6, 12, 24 godz., a następnie w odstępach 24-godzinnych, mianowano pobrany płyn znad hodowli. Każdorazowo pobierano płyn do mianowania z następnej kolejnej probówki.

Mianowanie wirusa krowianki, replikującego się w temp. 32°C i 37°C , przeprowadzano zawsze w temp. 37°C . Miano odczytywano po 48 godz. i po raz drugi po 72 godz. w celu upewnienia się, że słabo zaznaczone zmiany cytopatyczne są rzeczywiście wywołane wirusem krowianki.

WYNIKI BADAŃ

Stwierdzono, że wirus krowianki replikuje się w temp. 32°C i 37°C (tab. 1 i 2 oraz ryc. 1). W temp. 37°C już po 6 godz. od momentu zakażenia zaczyna wzrastać miano wirusa, osiągając w 12 godz. wartość 10^{-1} . Miano to utrzymuje się przez następne 12 godz., a potem wirus intensywnie namnaża się. W 48 godz. inkubacji miano wirusa dochodzi do wartości 10^{-4} . Maksymalne namnażanie się wirusa krowianki stwierdza się między 96 a 120 godz. po zakażeniu. Następnie miano stopniowo zaczyna spadać, aby po 264 godz. po zakażeniu osiągnąć wartość 10^{-2} . Dynamika replikacji wirusa krowianki w temp. 32°C , szczególnie w początkowej fazie, jest różna od dynamiki replikacji w temp. 37°C . W temp. 32°C miano zaczyna wzrastać dopiero po upływie 24 godz. po zakażeniu. Między 24 a 48 godz. intensywność namnażania się wirusa krowianki w temp. 32°C jest taka sama jak w temp. 37°C . Maksymalne namnażanie się wirusa krowianki w temp. 32°C stwierdza się w 96 godz. po zakażeniu. Wysokie miano utrzymuje się przez dużo dłuższy okres niż w temp. 37°C , bo aż do 192 godz., a następnie ilość wirusa zaczyna stopniowo maleć, jednak o wiele wolniej niż w temp.



Ryc. 1. Dynamika replikacji wirusa krowianki w temp. 32°C i 37°C
Dynamics of the replication of vaccinia virus at temp. 32°C and 37°C

37°C. W 264 godz. miano wirusa replikującego się w temp. 32°C jest wyższe o jeden logarytm niż wirusa namnażającego się w temp. 37°C.

Stwierdzono, że po zakażeniu komórek FL wirusem krowianki, a następnie inkubowaniu ich w temp. 37°C efekt cytopatyczny pojawia się już w 12 godz., a więc znacznie wcześniej niż w komórkach inkubowanych w temp. 32°C, kiedy to efekt cytopatyczny notujemy dopiero w 48 godz. Wystąpienie efektu cytopatycznego pokrywa się w czasie z pojawieniem się wirusa w płynie odżywczym.

+++	72	+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+	++	+	-
		+++	+++	+++	-	-	-	-	d.z.	+++	+	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+++	-	-
d.z.	96	+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	++	+	-
		+++	+++	+++	++	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+++	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
d.z.	120	+++	+++	+++	+	d.n.	+	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
d.z.	144	+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+	-	-
		+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+	-	-
		+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+	-	-
d.z.	168	+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
		+++	+++	+++	+	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	-
d.z.	192	+++	+	+	+	-	-	-	d.z.	+++	+	-	-
		+++	+	+	-	-	-	-	d.z.	+++	+	-	-
		++	-	-	-	-	-	-	d.z.	+	-	-	-
		++	+	+	-	-	-	-	d.z.	+	+	-	-
d.z.	216	++	+	+	+	-	-	-	+++	+	+	-	-
		+	+	+	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
		++	+	+	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	+++	+	+	-	-

Ciąg dalszy tab. 1

d.z.	240	++	+	+	-	-	-	-	+++	++	++	++	-
		++	+	-	-	-	-	+++	+++	++	+	-	-
		+++	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+	-
		+++	-	-	-	-	-	+++	+++	++	+	-	-
d.z.	264	+	+	-	-	-	-	+++	++	++	+	-	-
		+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
		++	+	-	-	-	-	+++	++	++	-	-	-
		+	-	-	-	-	-	+++	+	+	-	-	-

Objaśnienia: -- brak efektu cytopatycznego; + małe ogniska degeneracji w liczbie 1 do 3 na brzegach hodowli; ++ kilka miejsc z wyraźną degeneracją komórek; +++ duża liczba ognisk degeneracji poprzedzielanych zdrową tkanką, ale łączących się ze sobą; ++++ duże, zlewające się ogniska degeneracji, ponad 50% tkanki odklejonej od szkła; d.z. cała tkanka zdegenerowana i odklejona od szkła, płyn odżywczy mętny; d.n. degeneracja nieswoista.

Explanation: -- lack of cytopathic effect; + small degeneration foci (from 1 to 3) on the margin of tissue culture; ++ a few places with clear degeneration of cells; +++ a large number of degenerate foci interspersed with non-infected tissue but connected with each other; ++++ large fused foci of degeneration, over 50% of tissue unstuck from the glass; d.z. the whole tissue degenerated and unstuck from the glass, turbid nutrition fluid; d.n. unspecific degeneration.

Tab. 2. Efekt cytopatyczny wywołany wirusem krowianki z płynu hodowli FL inkubowanej w temp. 32°C
 Cytopathic effect brought about by vaccinia virus from the fluid of FL culture incubated at 32°C

Efekt cytopatyczny w tkankach wyszlowlonych Inkub. w 37°C. Cytopathic effect in organ. tissue cultures incub. at 37°C.	Godz. miano	Okres po zakażeniu Period after infection																	
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶				
		48 godz. 48 hrs					72 godz. 72 hrs												
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+	49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ciąg dalszy tab. 2

+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	-	-	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	-	-	d.z.	+++	+	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
d.z.	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	-	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
d.z.	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
d.z.	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
d.z.	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
d.z.	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
d.z.	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-
	+++	+++	+++	+++	+	+	-	d.z.	+++	+++	+	+	+	+	-

	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.	d.z.

Objasnienia jak w tab. 1 — Explanation as in Table 1.

Komórki FL zakażono wirusem krowianki rozcieńczonym do miana 10^{-4} . Stwierdzono, że efekt cytopatyczny charakterystyczny dla wirusa krowianki występuje wówczas dopiero trzeciego dnia inkubacji.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAN

Analizując wyniki przeprowadzonych badań, należy stwierdzić, że procesowi namnażania wirusa krowianki w hodowlach tkankowych towarzyszą zmiany degeneracyjne komórek, prowadzące do ich rozpadu, określone efektem cytopatycznym. Natężenie i czas wystąpienia tych zmian degeneracyjnych zależy od wielu czynników. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że czas wystąpienia efektu cytopatycznego zależy jest od dawki zakażającej wirusa i temperatury inkubacji zakażonych komórek.

Badając okres pojawienia się infekcyjnego wirusa i dynamiki jego nagromadzania się w płynnej frakcji hodowli, stwierdzono różnice między hodowlą inkubowaną w temp. 32°C i 37°C . W płynie zakażonych hodowli komórek FL, inkubowanych w 32°C , dojrzałe cząstki wirusa krowianki pojawiają się dopiero po 24 godz. inkubacji, a więc o wiele później niż w hodowlach inkubowanych w temp. 37°C , gdzie wirusa stwierdzono już po 6 godz.

Pojawienie się infekcyjnych cząsteczek wirusa w płynie utrzymującym synchronizowało się w czasie z wystąpieniem zmian cytopatycznych. Należy przypuszczać, że wydłużenie czasu trwania fazy eklipsy spowodowane jest zwolnionym w niższych temperaturach metabolizmem komórkowym, a to w konsekwencji prowadzi do wolniejszego procesu tworzenia się dojrzałych cząsteczek wirusowych. Na podobny fakt wydłużenia się fazy eklipsy zwrócił uwagę L w o f f (3) w badaniach nad polio-wirusami, podczas pasażowania ich w temperaturze obniżonej do 29°C . Bez wątplenia istnieje ścisła współzależność między szybkością replikacji wirusa a aktywnością wzrostu i przemianą materii zakażonych komórek. Pomimo opóźnionego pojawienia się infekcyjnych cząsteczek wirusa krowianki w temp. 32°C maksymalne namnażanie się go w przypadku obu temperatur (32°C , 37°C) zostało osiągnięte w tym samym czasie, tj. w 96 godz. replikacji. W temp. 37°C miano wirusa zaczęło następnie szybko spadać, począwszy od 120 godz. inkubacji. Natomiast w temp. 32°C stan najwyższego nagromadzenia się wirusa utrzymywał się aż do 196 godz. Następnie ilość wirusa zakaźnego także zaczęła maleć, jednak o wiele wolniej niż w temp. 37°C .

W trakcie doświadczeń nie zdołano wnieść nowych elementów do badań nad pochodzeniem szczepu stosowanego obecnie do uodporniania

przeciwno ospie. Jednak, jeżeli założenia Burneta są słuszne i protoplastą wirusa krowianki był właśnie wirus ospy ludzkiej, to chyba był to jakiś szczep *variola maior*, a nie *variola minor*, jak sugeruje Burnet. Badany przez nas szczep wirusa krowianki wykazał zdolność namnażania się zarówno w temp. 32°C, jak i 37°C, a więc jest bardziej podobny do wirusa *variola maior* niż wirusa *variola minor*. Wiadomo bowiem (4), że wirus *variola minor* zdolny jest do replikacji w temperaturze nie wyższej niż 36°C.

WNIOSKI

1. Czas pojawienia się ciałek elementarnych wirusa krowianki w zakażonej hodowli komórkowej zależy od dawki zakażającej wirusa i od temperatury inkubacji.
2. Zaznacza się duża różnica w spadku miana infekcyjnego wirusa krowianki poddanego działaniu temp. 32°C i 37°C.
3. Badany szczep wirusa krowianki ze względu na zdolność namnażania się w temp. 32°C i 37°C jest bliższy wirusowi *variola maior* niż *variola minor*.

PIŚMIENICTWO

1. Burnet F. M.: Principles of Animal Virology. Academic Press., New York—London 1960.
2. Kawecki Z.: Culture of Virus of Tick-borne Encephalitis in Various Tissue Lines. Acta Microbiol. Polon., 13, 299 (1964).
3. Lwoff A., Lwoff M.: Sur les facteurs du développement viral et leur rôle dans l'évolution d'infection. Ann. Inst. Pasteur., 28, 173 (1960).
4. Mariennikowa C. B., Gurwicz E. B.: O swojstwach wirusa allastrima. Wopr. Wirusoł., 4, 439 (1965).
5. Sołowiew W. D., Matisukowa J. N., Jarosławskaja T. N.: O wozmożnosti transformacji wirusa naturalnoj ospy w wirus waksyny w eksperimentie. Wopr. Wirusoł., 3, 307 (1965).

РЕЗЮМЕ

Исследовали динамику процесса репликации вируса вакцины при температуре 32°C и 37°C. Констатировано, что появление первых заразных частиц вируса и выступление цитопатических изменений зависит от заражающей дозы вируса и температуры инкубации зараженных клеток. В это же время получены максимальные титры зараженных частичек вируса вакцины при исследуемых температурах инкубации.

SUMMARY

Dynamics of the replication process of vaccinia virus was studied at the temperatures of 32°C and 37°C. It was stated that the appearance of first infectious particles of virus and the occurrence of cytopathic changes depend on the infectious dose of virus and on the incubation temperature of infected cells. At the same time maximum titres of infectious particles of vaccinia virus were obtained at both the examined temperatures of incubation.