

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Zygmunt Hencner

Anna SIDOR-WÓJTOWICZ, Leon JABŁOŃSKI

**Badania nad zmiennością wirusa Coxsackie B 6 Schmitt
pod wpływem różnych temperatur. Charakterystyka mutantów**

Исследования изменчивости вирусов Coxsackie B 6 Schmitt под влиянием
разных температур. Характеристика мутантов

Investigations on the Mutability of Coxsackie B 6 Schmitt Virus under the
Influence of Different Temperatures. Characteristics of Mutants

Szereg autorów zajmowało się problemem wpływu środowiska na zmienność wirusów (1—10, 14—21, 23—27). Niewątpliwie przyczyniły się do tego także osiągnięcia w dziedzinie nowo stosowanych metod. Jak wiadomo, duży wpływ na zmienność genotypową wirusów oraz na uzyskiwanie różnych mutantów wywiera środowisko, a jednym z czynników środowiska jest temperatura. Pasażowanie wirusów w temperaturze supra- i infraoptymalnej powoduje zmianę ich cech biologicznych (1—3, 5—10, 14—20, 23—27).

Celem naszej pracy było badanie wpływu nieoptymalnych temperatur na powstawanie odmian wirusa Coxackie B 6 Schmitt.

MATERIAŁ BADAWCZY

W przedstawionych badaniach posługiwano się szczepem prototypowym Coxackie B 6 Schmitt, otrzymanym z kolekcji szczepów Narodowego Instytutu Zdrowia Stanów Zjednoczonych (Bethesda, USA). Do badań serologicznych oraz kontroli pasażowanych szczepów używano surowic odpornościowych otrzymanych po szczepieniu królików szczepem prototypowym Coxackie B 6 według metody podanej w pracy Jabłońskiego (14). Do odczynu hemaglutynacji użyto krwinek czerwonych ludzi dorosłych i noworodków grupy „0”, małp *Cercopithecus aetiops* oraz kurzych.

Wszystkie badania wykonano w hodowli komórek nerek małp (*Cercopithecus aetiops*). Hodowle komórek otrzymywano z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Jako pożywki podtrzymującej używano płynu Parkera i Earla. Ponadto w dalszych badaniach używano hodowli komórek linii pasażowanych Fl, KB, HeLa.

METODYKA BADAŃ

1. Pasażowanie szczepu Coxsackie B 6 Schmitt w temperaturze 30°, 37° i 40°. Przed przystąpieniem do pasażowania ujednociano skład populacji prototypowego szczepu za pomocą trzykrotnego zakażenia hodowli komórek metodą krańcowych

rozcieńczeń, co wystarcza do otrzymania czystej populacji szczepu klonalnego, który pod względem genetycznym jest jednorodny. Dalsze metody pasażowania opisane są w pracy Jabłońskiego (15).

2. Obliczanie miana wirusów używanych do badań przeprowadzano wg metody Reeda i Muencha.

3. Surowice do badań otrzymano przez uodpornienie królików wg metody podanej w pracy (14).

4. W celu określenia budowy antygenowej badanych wirusów, wykonywano odczyn krzyżowej neutralizacji metodą „alfa” i „beta”. Odczyny te wykonywano metodą opisaną przez Przesmyckiego i Sawickiego (28).

5. Badanie cech fizykochemicznych wirusów:

a) Badania wrażliwości szczepów na działanie eteru przeprowadzano według metody opisanej przez Melnicka (22).

b) Badanie wrażliwości szczepów na działanie obniżonego pH wykonano metodą podaną w pracy (15).

c) Stabilizację kationami na działanie temperatury 50° przeprowadzono według metody opisanej przez Melnicka (22).

6. Odczyn hemaglutynacji wykonywano metodą podaną przez Goldfielda i wsp. (11).

7. Badanie wzrostu wirusów na różnych hodowlach komórek. Badanymi szczepami wirusów zakażano po 9 próbek hodowli komórek nerek małp oraz hodowle komórek linii pasażowanych Fl, KB, HeLa, L w ilości 100 TCID₅₀ w 0,1 ml. Następnie inkubowano w odpowiednich temperaturach. Po 4 dniach mieszano zawartość próbek i oznaczano miano wirusów w hodowli komórek nerek małp.

8. Oznaczano cechy rct₃₀, rct₃₇ i rct₄₀ przy pomocy określania kinetyki wzrostu badanych wirusów w temperaturze 30°, 37° i 40°. Każdym badanym szczepem wirusa zakażano 3 butle Legroux, hodowli komórek nerek małp w ilości 100 TCID₅₀/0,1 ml. Każdą butelkę hodowli (po zakażeniu) umieszczano w temperaturze 30°, 37° i 40°. W ciągu 7 dni, codziennie o określonej godzinie pobierano 0,2 ml płynu i oznaczano miano wirusów w hodowli komórek nerek małp.

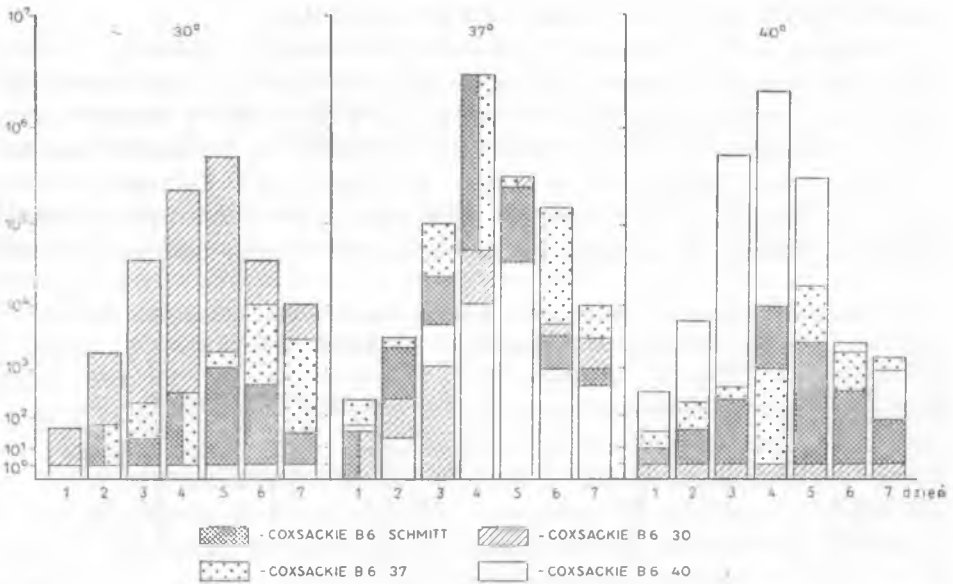
9. Zdolność wytwarzania lysinek — cecha „S”, przeprowadzano w hodowli komórek nerek małp w butlach Legroux, metodą dwuwarstwową wg metody podanej przez Hsiunga i Melnicka (12, 13). Cechę „d” oznaczano tą samą metodą po wprowadzeniu modyfikacji własnej, polegającej na tym, że dodawano mniejszą ilość NaHCO₃ 7,5%, a mianowicie 1,5%.

WYNIKI BADAŃ

Po wykonaniu 25 pasażów szczepu wirusa Coxsackie B 6 Schmitt w temperaturach 30° (± 0,5°), 40° (± 0,3°) otrzymano dwie odmiany badanego szczepu: „zimną” Coxsackie B 6 i „gorącą” Coxsackie B 6 40. Równocześnie przeprowadzono pasaż wirusa w temperaturze 37° (± 5,0°) w celu sprawdzenia wpływu temperatury optymalnej na właściwości tego wirusa. Otrzymane trzy odmiany 30, 37, 40 wykazywały właściwości fizykochemiczne charakterystyczne dla Enterowirusów i zachowywały się jak szczep prototypowy (Coxsackie B 6 Schmitt).

W wyniku przeprowadzonych krzyżowych odczynów neutralizacji, nie wykazano różnic w budowie antygenowej szczepu prototypowego i jego odmian uzyskanych po pasażach w nieoptymalnych temperaturach. Otrzymane mutanty nie różniły się także właściwościami hemaglutynacyjnymi, zdolnością wzrostu w hodowlach komórek linii pasażowanych i pierwotnych.

Cechy genetyczne ret_{40} i ret_{30} badano, określając kinetykę wzrostu wirusów w hodowli komórek nerek małą w temperaturze 30° i 40° . Wyniki badań przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Kinetyka wzrostu wirusów Coxsackie B 6 i ich odmian w temperaturze 30° , 37° i 40° C

Kinetics of the growth of the Coxsackie B 6 viruses and their variants at the temperatures of 30° , 37° and 40° C

Jak wynika z przedstawionej ryciny szczep prototypowy wirusa Coxsackie B 6 Schmitt namnaża się w najniższym mianie w temperaturze 37° ($10^{6.5}$). Słabiej namnażają się te wirusy w 30° , w piątym dniu od zakażenia hodowli komórek miano wynosiło $10^{3.0}$. W temperaturze 40° w czwartym dniu od zakażenia hodowli komórek, miano wynosiło $10^{4.0}$, w pozostałych dniach od zakażenia $10^{1.0}$ do $10^{3.5}$.

Odmiana pasażowana w temperaturze 37° najlepiej namnaża się w temperaturze optymalnej w mianie $10^{6.5}$, a w temperaturze 30° i 40° osiąga miano około $10^{4.0}$. W populacji wirusa prototypowego i odmiany 37,

znajdują się cząstki zdolne namnażać się we wszystkich trzech temperaturach 30°, 37° i 40°.

Odmiana gorąca pasażowana w 40° najlepiej namnaża się w temperaturze optymalnej w mianie 10^{6,28}, w temperaturze 37° w mianie 10^{4,5}. Nie namnaża się w temperaturze 30°. W populacji tego wirusa brak jest cząstek zdolnych namnażać się w temperaturze 30° i posiada cechy rct₃₀₋ i rct₄₀₊. Wzrost odmiany pasażowanej w 30° różni się od poprzedniej. Najlepiej namnaża się ona w hodowli komórek inkubowanych w temperaturze 30°, w piątym dniu od zakażenia w mianie 10^{5,67} oraz w temperaturze 37° (10^{5,5}). Odmiana ta nie namnaża się w temperaturze 40. Posiada ona cechy genetyczne rct₃₀₊ i rct₄₀₋.

Następne badania dotyczyły zdolności wytwarzania łyseinek — cecha „S” przez szczepy wirusów: Coxsackie B 6 prototypowy i odmiany 30, 37 i 40. Szczep prototypowy wirusa Coxsackie B 6 Schmitt oraz odmiany 30 i 37 posiadają zdolność wytwarzania łyseinek po zakażeniu hodowli komórek nerek małp. Jest to cecha genetyczna S⁺. Odmiana 40 nie wytwarza łyseinek jest to cecha S⁻. Dokładna analiza czasu powstawania łyseinek wykazała, że najszybciej pojawiają się łyseinki odmiany zimnej.

Tab. 1. Zdolność wytwarzania łyseinek przez wirusy Coxsackie B 6
Size of plaques produced by Coxsackie B 6 viruses

Wirusy Coxsackie B 6	Cecha „S”	Średnia wielkość łyseinek w mm	
		po 5 dniach	po 7 dniach
Schmitt	+	5,0—5,3	6,1—6,4
30	+	7,6—7,9	8,4—9,1
37	+	5,1—5,6	6,0—6,5
40	—	—	—

Objaśnienie:

+ wirusy wytwarzają łyseinki (viruses produce plaques)

— wirusy nie wytwarzają łyseinek (viruses do not produce plaques)

Stwierdzono je już po 36 godzinach inkubacji. Po 48—60 godzinach inkubacji obserwowano łyseinki wytwarzane przez szczep prototypowy wirusa Coxsackie B 6 Schmitt. Początkowo łyseinki te były małe o rozmytym i bardzo niewyraźnym brzegu. Po 96 godzinach inkubacji, wielkość łyseinek znacznie się powiększała, ale brzeg pozostawał nadal nieregularny i niewyraźny. W tab. 1 przedstawiono średnią wielkość łyseinek wytwarzanych przez badane wirusy po 5 i 7 dniach inkubacji.

Wirus Coxsackie B 6 Schmitt, wytwarza łyseinki wielkości 5,0—6,4 mm średnicy (tabl. I/1). O zbliżonej wielkości od 5,1—6,5 mm średnicy łyseinki, wytwarzają wirusy Coxsackie B 6 odmiany 37 (tabl. I/2).

Tab. 2. Zdolność wytwarzania łyseinek przez wirusy Coxsackie B 6 w zmniejszonej koncentracji NaHCO_3 Size of plaques produced by Coxsackie B 6 viruses in the reduced concentration of NaHCO_3

Wirusy Coxsackie B 6	Cecha „S”	Średnia wielkość łyseinek w mm	
		po 5 dniach	po 7 dniach
Schmitt	+	3,1—3,5	4,0—4,2
30	+	4,2—5,0	5,4—6,0
37	+	3,3—3,9	4,2—4,9
40	—	—	—

Objaśnienie:

+ wirusy wytwarzają łyseinki (viruses produce plaques)

— wirusy nie wytwarzają łyseinek (viruses do not produce plaques)

Większe łyseinki natomiast wytwarza szczep wirusa Coxsackie B 6 odmiany 30 (tabl. I/3). Badania następne dotyczyły wytwarzania łyseinek przez wirusy w zmienionej koncentracji NaHCO_3 — cecha „d”. Podobnie jak w wypadku oznaczenia cechy „S”, łyseinki wytwarzają szczepy wirusów Coxsackie B 6 Schmitt oraz odmiana „zimna” i 37, posiadają więc cechę d⁺. Nie wytwarzają łyseinek odmiana „gorąca” — cecha d⁻. Obserwowane łyseinki wytwarzane są przez badane wirusy nieco później jak przy oznaczaniu cechy „S”, dopiero po 48—60 godzinach inkubacji. W tab. 3 przedstawiono średnie wielkości łyseinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 Schmitt i odmiany 30 i 37 po 5 i 7 dniach inkubacji. łyseinki wytwarzane w zmniejszonej koncentracji NaHCO_3 są średnio o 2 mm mniejsze od łyseinek wytwarzanych w warunkach optymalnych. Wielkość łyseinek wytwarzanych przez szczep prototypowy i odmianę 37 osiąga wielkość od 3,1 do 4,9 (tabl. I/4 i 5). łyseinki wytwarzane przez odmianę „zimną” są nieco większe i wielkość ich wynosi od 3,9 do 6 mm (tabl. I/6).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Rozpatrując zmienność właściwości antygenowych i patogennych u wirusów stwierdzono, że u jednych zaznacza się skłonność do zmienności w zakresie chorobotwórczości (5, 8, 9—11, 18—20) u innych zaś do zmienności w składzie antygenowym (14—16, 26, 27). Zmienność wirulencji obserwuje się często w grupie enterowirusów, które stanowią dobry model do badania mechanizmu zmienności pod wpływem czynników środowiska.

Współcześnie istnieją dwa przeciwstawne poglądy tłumaczące zmien-

ność wirusów pod wpływem środowiska: Pierwszy, którego przedstawiciele uważają, że mutacje powstają na drodze adaptacji do środowiska. Pogląd ten został obalony po zastosowaniu analizy klonalnej szczepów wyjściowych. Gendon i wsp. (8), Lwoff (18—20), Sabin (23) wykazali, że populacja wirusów jest niejednorodna pod względem cech genetycznych. Przedstawicielami drugiego natomiast są Burnet (2, 3), Findley (7) i Luria (21), którzy interpretują zjawisko zmienności w sposób zgodny z zasadami genetyki klasycznej. Populacje mikroorganizmów, a szczególnie populacje wirusów są bardzo liczne, przy dużej więc liczbie pokoleń istnieje możliwość zjawiania się większej liczby mutantów. Środowisko działa w tym wypadku jako czynnik selektywny. Selekcja prowadzi do reprodukcji mutantów zdolnych do wzrostu w danym środowisku.

Z naszych badań wynika, że temperatura podwyższona 40° i obniżona 30° powoduje zmianę cech genetycznych wirusów. W wyniku przeprowadzonych 25 pasażów w temperaturach nie optymalnych otrzymano odmianę „zimną” i „gorącą”. Różnią się one cechami genetycznymi rct_{30} i rct_{40} , zdolnością wytwarzania łąsinek — cecha „S” i „d”. Odmiany te mogły powstać na skutek działania trzech mechanizmów biologicznych; adaptacji fenotypowej, selekcji i mutacji spontanicznej. Zastosowana w naszych badaniach metodyka, nie wyklucza żadnej z przedstawionej możliwości. Populacja wirusów jest niejednorodna i może zawierać cząsteczki o różnych właściwościach. Zostało to potwierdzone w przeprowadzonych badaniach. Wirusy Coxsackie B 6 Schmitt namnażały się w niskich mianach w temperaturze 30° i 40° . W otrzymaniu mutantów dużą rolę odgrywał również mechanizm selekcji wirusów pod wpływem temperatury inkubacji. Odpowiednie warunki hodowli sprzyjały rozwojowi mutantów spontanicznych najbardziej przystosowanych do zmienionych warunków.

Wnioski

1. Metodą pasażowania w nie optymalnych temperaturach (30° i 40°) szczepu prototypowego wirusa Coxsackie B 6 Schmitt otrzymano odmianę „zimną” i „gorącą”.

2. Za pomocą badań genetycznych wykazano, że odmiana „zimna” posiada cechy rct_{30+} , rct_{40-} , S^{+} i d^{+} , a odmiana „gorąca” cechy rct_{30-} , rct_{40+} , S^{-} i d^{-} .

3. W badaniach porównawczych ze szczepem wyjściowym stwierdzono, że cechy fizyko-chemiczne odmian wirusów Coxsackie B 6 nie uległy zmianie pod wpływem pasażowania w nie optymalnych temperaturach.

4. Za pomocą krzyżowych badań serologicznych stwierdzono, że otrzymane odmiany nie różnią się budową antygenową od szczepu wyjściowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Bondreault A., Pavilanis V.: *Canad. Biol.* **3**, 253—254, 1964.
2. Burnet F. M.: Stationery Office, London H. M., 1936.
3. Burnet F. M.: Doerr und Hallauer. Springer Verlag. Wien, 1958.
4. Burnet F. M.: *Wirusologia*, PZWL, Warszawa, 1958.
5. Carp R. J., Koprowski H.: *Virology* **1**, 99—106, 1962.
6. Fenner F., Sambrook J. F.: *Ann. Rev. Microb.* **18**, 47—92, 1964.
7. Findley G. M.: *Jour. Roy. Microbiol.* **56**, 213—218, 1936.
8. Gendon J. Z., Marczenko A. T.: *Genetyka* **5**, 110—118, 1966.
9. Gevandau P., Charrel J.: *Compt. Rend. Soc. Biol.* **1**, 139—141, 1966.
10. Gevandau P., Charrel J., Pieroni G.: *Ann. Inst. Pasteura* **114**, 209—215, 1968.
11. Goldfield M., Srihongse S., Fox J. P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 788—791, 1957.
12. Hsiung G. D., Melnick J. L.: *J. Immunol.* **78**, 128—136, 1957.
13. Hsiung G. D., Melnick J. L.: *J. Immunol.* **80**, 282—293, 1958.
14. Jabłoński L.: *Med. Dośw. Mikrobiol.* **18**, 61—66, 1966.
15. Jabłoński L.: *Med. Dośw. Mikrobiol.* **20**, 55—61, 1968.
16. Jabłoński L.: *Med. Dośw. Mikrobiol.* **20**, 191—194, 1968.
17. Jabłoński L., Grzybek D., Bakalczyk A.: *Med. Dośw. Mikrobiol.* **20**, 305—308, 1968.
18. Lwoff A., Lwoff M.: *Comp. Rend. Acad. Sci.* **246**, 190—195, 1958.
19. Lwoff A., Horne R., Tourner P.: *Cold. Spr. Harb. Symp. Quand. Biol.* **28**, 159—172, 1962.
20. Lwoff A., Lwoff M.: *Comp. Rend. Acad. Sci.* **27**, 51—58, 1964.
21. Luria S. E.: *General Virology*, New York 1953.
22. Melnick J. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **101**, 331—342, 1962.
23. Sabin A. B.: *Perspect. Vir. vol. II* M. Pollard ed. Minneapolis, Burges Publ. 90—110, 1961.
24. Sokołow M. J.: *Wopr. Wirusol.* **5**, 531—536, 1963.
25. Sokołow M. J., Łozińska T. M.: *Wopr. Wirusol.* **6**, 692—698, 1963.
26. Wittman H. G., Wittman-Liebold N., Jauregui-Adell J.: *Z. Naturforschung* **20**, 1224—1235, 1965.
27. Wittman-Liebold N., Jauregui-Adell J., Wittman H. G.: *Z. Naturforschung*, **20b**, 1235—1242, 1965.
28. *Zarys Wirusologii praktycznej*, red. W. Przesmycki. PZWL, Warszawa, 1963.

Otrzymano 20 IV 1970.

OBJAŚNIENIA TABLICZY

Tabl. I/1. Wygląd lysinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 Schmitt po 96 godzinach inkubacji.

Tabl. I/2. Wygląd lysinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 odmianę 37 po 96 godzinach inkubacji.

Tabl. I/3. Wygląd łysinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 odmianę 30 po 96 godzinach inkubacji.

Tabl. I/4. Wygląd łysinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 Schmitt w zmniejszonej koncentracji NaHCO_3 po 120 godzinach inkubacji.

Tabl. I/5. Wygląd łysinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 odmianę 37 w zmniejszonej koncentracji NaHCO_3 po 120 godzinach inkubacji.

Tabl. I/6. Wygląd łysinek wytwarzanych przez wirusy Coxsackie B 6 odmianę 30 w zmniejszonej koncentracji NaHCO_3 po 120 godzinach inkubacji.

РЕЗЮМЕ

При пассаже в неоптимальных температурах 30° и 40°C штамма вируса Coxsackie B 6 (Schmitt) получили два мутанта — „холодный” и „горячий”. При сравнительных исследованиях мутантов с исходным штаммом не констатировали различия физико-химических и серологических признаков. С помощью серологических исследований обнаружили, что полученные мутанты не отличаются антигенной структурой от исходного штамма. При генетических исследованиях констатировали, что „холодный” мутант обладает генетическими свойствами rct_{30+} , rct_{40-} , S^+ и d^+ ; горячий мутант имеет генетические признаки rct_{30-} , rct_{40+} , S^- и d^- . Исследования показывают, что при пассаже вируса Coxsackie B 6 при температурах 30° и 40° он изменяет свои биологические свойства.

SUMMARY

The strain of Coxsackie B 6 Schmitt virus was passaged at the temperatures of 30° and 40°C and two variants "cold" and "hot" were obtained.

The comparative studies of new variants and the original strain of virus did not show any physico-chemical and antigenic changes. Genetic investigations, on the other hand, demonstrated that the "cold" variant has rct_{30+} , rct_{40-} , S^+ and d^+ markers, whereas the "hot" variant — rct_{30-} , rct_{40+} , S^- and d^- markers.

The investigations showed that Coxsackie B 6 virus changes its biological properties during passage at the temperatures of 30° and 40° .

EXPLANATION OF TABLE

Tabl. I/1. The plaques produced by Coxsackie B 6 Schmitt viruses after 96 hours of incubation.

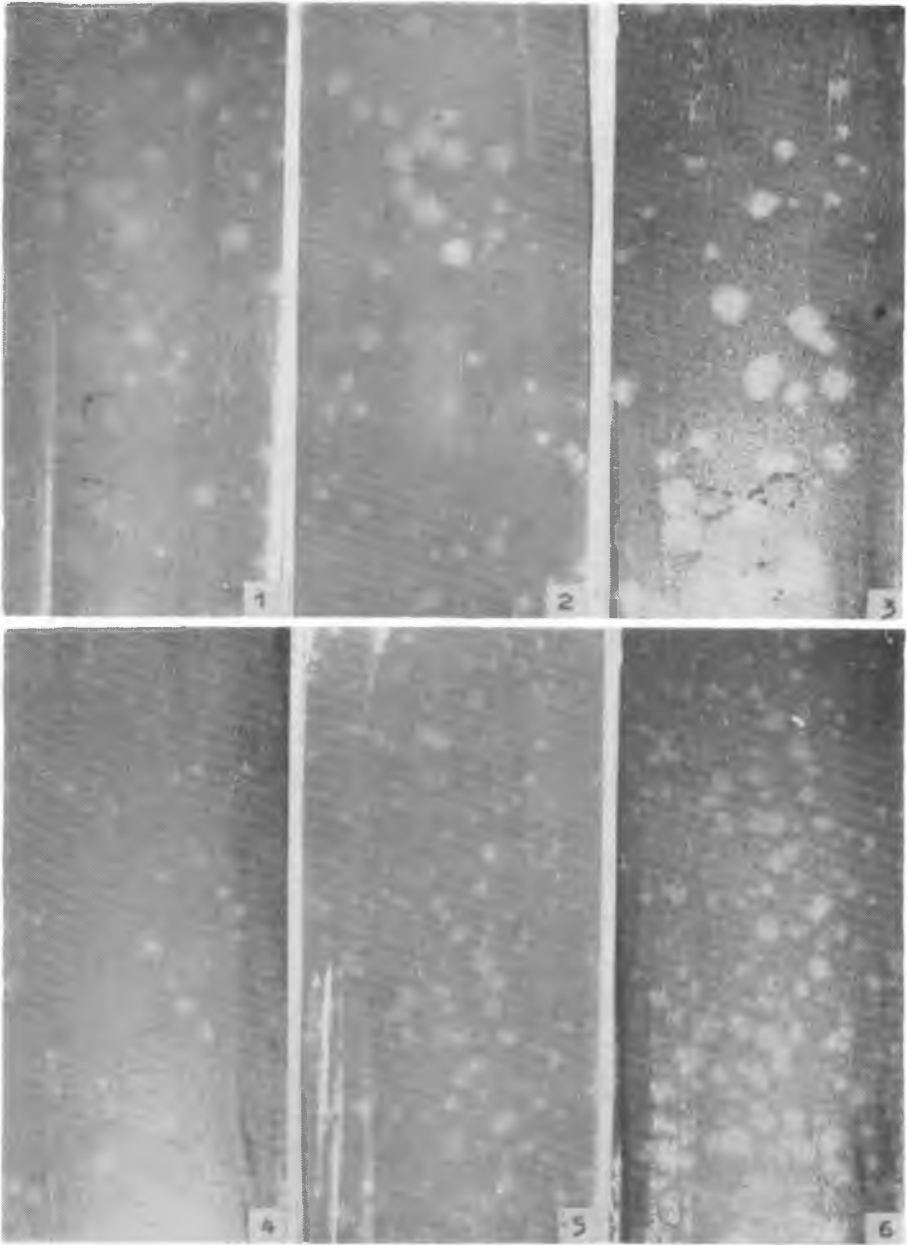
Tabl. I/2. The plaques produced by Coxsackie B 6 viruses, variant 37, after 96 hours of incubation.

Tabl. I/3. The plaques produced by Coxsackie B 6 viruses, variant 30, after 96 hours of incubation.

Tabl. I/4. The plaques produced by Coxsackie B 6 Schmitt viruses at the reduced concentration of NaHCO_3 after 120 hours of incubation.

Tabl. I/5. The plaques produced by Coxsackie B 6 viruses, variant 37, at the reduced concentration of NaHCO_3 after 120 hours of incubation.

Tabl. I/6. The plaques produced by Coxsackie B 6 viruses, variant 30, at the reduced concentration of NaHCO_3 after 120 hours of incubation.



Anna Sidor Wojtowicz, Leon Jabłoński

