

Zakład Mikrobiologii. Wydział Farmaceutyczny. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Jadwiga Szczygielska

Maria BLASZYŃSKA

**Wrażliwość komórek niektórych linii ciągłych na zakażenie wirusami
paragrypy**

Чувствительность клеток некоторых перевиваемых линий к заражению вирусом
парагриппа

The Susceptibility of some Continuous Cell Lines
to Parainfluenza Virus Infection

Pierwotna hodowla komórek nerki małp wykazuje dużą wrażliwość na zakażenie wszystkimi typami wirusów paragrypy (4). Dotychczas większość szczepów od chorych wyizolowano na tym podłożu. Z drugiej strony komórki pochodzące od różnych gatunków małp są niejednakowo wrażliwe wobec wirusów paragrypy (8). Komórki te mimo niewątpliwych walorów są dla wielu pracowni trudno dostępne ze względu na brak odpowiednich źródeł zaopatrzenia i duży koszt (7, 14). Poważnym problemem związanym z użyciem pierwotnej hodowli komórek nerki małp do badań nad mykso- i paramyksowirusami są częste (3, 7) zakażenia latentne hemadsorbującymi wirusami małpimi. Szczególne kłopoty sprawia wirus SV5, antygenowo spokrewniony (3) z ludzkim wirusem paragrypy typu 2 (CA). Ciągłe linie komórkowe chociaż mniej podatne na zakażenie wirusami paragrypy, przedstawiają jednak pewne możliwości ich namnażania. Ważną zaletą linii ciągłych jest brak zakażeń latentnymi wirusami małpimi. Wykazują też one stałą wrażliwość wobec określonych szczepów wirusowych przy zachowaniu standardowych warunków hodowli komórek (9). Komórki linii ciągłych znalazły zastosowanie w przygotowaniu antygenów wirusów paragrypy do badań serologicznych. Uzyskana niedawno ciągła linia komórek WISH okazała się przydatna do namnażania wielu różnych wirusów. Łuczak i Korbecki (12) wykazali, że nadaje się ona również do namnażania wirusów paragrypy typu 3. Nie była natomiast bliżej zbadana wobec wirusów paragrypy typu 1 i 2.

W obecnej pracy badano wrażliwość ciągłych linii komórkowych He-La, KB i FL oraz komórek linii WISH na zakażenie wirusami paragrypy typu 1 (C-39) i typu 2 (CA). Stopień wrażliwości tych komórek określono na podstawie wysokości miana zakaźnego wirusa. Porównawczo oznaczono też miana badanych wirusów w

pierwotnej hodowli komórek nerki małp. W próbach wstępnych zbadano dynamikę narastania miana zakaźnego wirusów w hodowli komórek He-La i FL.

MATERIAŁY I METODY

Wirusy. Wirus paragrypy typu 1 (szczep C-39), otrzymano z Zakładu Wirusologii PZH w Warszawie. Do badań użyto wirus z 11 i 12 pasażu w pierwotnej hodowli komórek nerki małp. Wirus paragrypy typu 2 (CA) otrzymano z The Virus Reference Laboratory, Central Public Health, Colindale, London. Wirus użyty do badań przeszedł w naszym laboratorium 13—14 pasaży w pierwotnej hodowli komórek nerki małp. Wirusy hodowano w temperaturze 34°C.

Hodowle komórek. Pierwotne hodowle komórek nerki małpiej kupowane w Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Komórki FL otrzymano od doc. dr Kaweckiego z Zakładu Mikrobiologii Szczegółowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Komórki He-La, KB i WISH otrzymano z Pracowni Enterowirusów PZH w Warszawie. Podłoże wzrostowe dla komórek KB i FL zawierało 90% podłoża Parkera i 10% inaktywowanej surowicy cielęcej. Podłoże wzrostowe dla komórek He-La składało się z 80% płynu Hanksa z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktalbuminy i 20% inaktywowanej surowicy cielęcej. Komórki WISH hodowano w podłożu zawierającym 75% podłoża Parkera, 15% płynu Hanksa z hydrolizatem laktalbuminy (0,5%) i 10% inaktywowanej surowicy cielęcej. Komórki linii ciągłych hodowano w temperaturze 37°C. Do badań były używane dwudniowe jednowarstwowe hodowle próbowkowe. Przed zakażeniem usuwano z próbek podłoże wzrostowe, hodowle przepłukiwano dwa razy płynem PBS i dodawano po 1 ml podłoża Parkera. Kolejnymi 10-krotnymi rozcieńczeniami wirusa w płynie PBS zakażano po 4 próbówki z hodowlą komórek linii ciągłych lub po 3 próbówki z hodowlą komórek nerki małpy, dodając po 0,2 ml rozcieńczenia na próbkę. Do próbek kontrolnych zamiast wirusa dodawano po 0,2 ml płynu PBS. Zakażone hodowle inkubowano w temperaturze 34°C przez 4 dni. Zakażenie wykrywano przy pomocy odczynu hemadsorpcji.

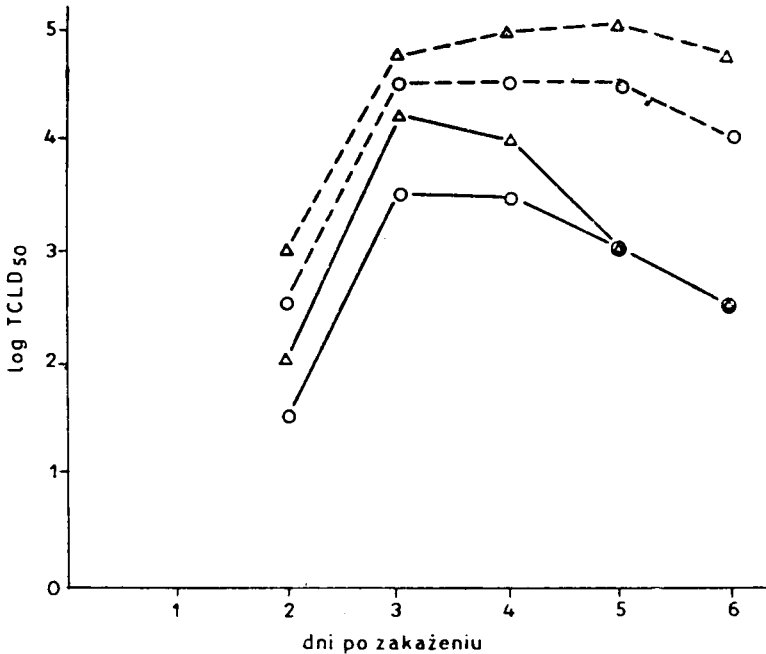
Odczyn hemadsorpcji. Do próbek z hodowlą komórek zakażonych wirusami dodawano po 0,2 ml 0,4% zawiesiny krwinek czerwonych świnki morskiej w płynie PBS. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze 4°C odczytywano wynik pod mikroskopem. Miano zakaźne wirusów obliczano według metody Reeda-Muencha. Dla porównania wysokości miana zakaźnego poszczególne próbki wirusów miareczkowano jednocześnie w czterech badanych liniach komórkowych. Wykonano trzy doświadczenia z wirusem typu 1 i pięć doświadczeń z wirusem typu 2 i obliczono średnią dla każdego wirusa i systemu komórkowego.

Dla porównania wrażliwości linii ciągłych i pierwotnej hodowli komórek nerki małp wykonano dodatkowo miareczkowanie obydwu wirusów w komórkach He-La i w pierwotnej hodowli komórek nerki małp. W próbach wstępnych określono dynamikę narastania miana zakaźnego badanych wirusów w komórkach He-La i FL po zakażeniu dawką 1000 TCID₅₀. Codziennie przez okres sześciu dni zbierano po 3 próbówki z zakażoną hodowlą i przechowywano w temperaturze -20°C. Po zakończonym okresie inkubacji hodowle 3 razy zamrażano i odtajano. Po odwirowaniu oznaczano miano zakaźne wirusów w płynach hodowli z poszczególnych dni inkubacji. Miareczkowanie wykonano w komórkach He-La.

WYNIKI

Na podstawie odczynu hemadsorpcji stwierdzono zdolność namnażania się wirusów paragrypy typu 1 (C-39) i typu 2 (CA) we wszystkich czterech badanych ciągłych liniach komórek: He-La, KB, FL i WISH. Ryc. 1 przedstawia dynamikę narastania miana zakaźnego wirusów paragrypy typu 1 i 2 w komórkach He-La i FL po zakażeniu dawką 1000 TCID₅₀. Hemadsorpcja pojawiała się w hodowlach komórek już w drugim dniu po zakażeniu i utrzymywała się do końca doświadczenia. Szczyt miana zakaźnego przypadał na okres od 3 do 5 dnia po zakażeniu. Zaobserwowano pewną różnicę w rozwoju wirusa typu 1 i 2. Po dojściu do szczytu miano zakaźne wirusa typu 1 utrzymywało się na wysokim poziomie. Nie wielki spadek miana występował w końcowym okresie doświadczenia. Miano zakaźne wirusa typu 2 opadało natomiast wyraźnie wkrótce po osiągnięciu szczytu.

Tab. 1. przedstawia miana zakaźne wirusów w czterech ciągłych liniach komórkowych. Miana te stanowią średnią z trzech doświadczeń wykonanych z wirusem typu 1 i pięciu doświadczeń wykonanych z wiru-



Ryc. 1. Dynamika narastania miana zakaźnego wirusów paragrypy typu 1 (C-39) i typu 2 (CA) w hodowli komórek He-La i FL po zakażeniu dawką TCID₅₀. The dynamics of the multiplication of parainfluenza viruses type 1 (C-39) and type 2 (CA), in He-La and FL cells inoculated with 1000 TCID₅₀ of virus

sem typu 2. Na podstawie wysokości miana zakaźnego określono wrażliwość komórek na zakażenie. Największą wrażliwość (najwyższe miano zakaźne) na zakażenie wirusem typu 1 wykazały komórki KB (10^4 TCID₅₀), mniejszą — komórki WISH ($10^{3,66}$ TCID₅₀). Najmniejszą, jednakową wrażliwość wykazały komórki He-La i FL ($10^{3,5}$ TCID₅₀). Najbardziej wrażliwe na zakażenie wirusem paragrypy typu 2 okazały się komórki KB ($10^{3,9}$ TCID₅₀) mniej wrażliwe były kolejno komórki WISH ($10^{3,75}$ TCID₅₀), He-La ($10^{3,5}$ TCID₅₀) i FL ($10^{2,66}$ TCID₅₀). W porównawczym badaniu wrażliwości komórek He-La i pierwotnych komórek nerki małpiej miano zakaźne obu wirusów w komórkach He-La były o około 4 log. niższe.

Tab. 1. Miano zakaźne wirusów paragrypy typu 1 (C-39) i typu 2 (CA) w ciągłych liniach komórek
Infectivity titers of parainfluenza viruses type 1 (C-39) and type 2 (CA), in continuous linear cells

Wirus	Miano zakaźne log TCID ₅₀ w komórkach			
	KB	WISH	He-La	FL
para 1 (C-39)	4,0	3,66	3,5	3,5
para 2 (CA)	3,9	3,75	3,5	2,66
kontrola	0	0	0	0

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wielu autorów stwierdziło niewrażliwość ciągłych linii komórkowych na wirusy paragrypy typu 1 (HA-2) (1, 2, 4, 6, 11, 13, 14). Dotychczas tylko w nielicznych publikacjach donoszono o namnażaniu się wirusa paragrypy typu 1 w komórkach linii ciągłych (8, 10, 15, 16). Wyniki badań własnych wykazały, że wirus paragrypy typu 1 (C-39) rósł dobrze w czterech badanych liniach ciągłych. Wydaje się, że pewne szczepy wirusów paragrypy typu 1 pasażowane kilkakrotnie w pierwotnej hodowli komórek nerki małp zyskują zdolność namnażania się również w komórkach linii ciągłych. Wirus paragrypy typu 2 (CA) zgodnie z licznymi doniesieniami namnażał się dobrze w liniach ciągłych.

Badania własne, a także wyniki prac innych autorów wskazują, że komórki KB są najbardziej spośród badanych linii ciągłych wrażliwe na zakażenie wirusami paragrypy. Chan y i wsp. (5) stwierdzili, że są one bardziej wrażliwe na wirus paragrypy typu 3 (EA 102) niż komórki He-

-La i pierwotne komórki nerki małpiej. Henry i wsp. (8) izolowali więcej wirusów paragrypy w komórkach KB niż w innych liniach ciągłych.

Komórki WISH są stosunkowo nową linią ciągłą. Jak wykazali Łuczak i Korbecki (12) stanowią one dobre podłoże dla rozwoju wirusów paragrypy typu 3. Badania własne z użyciem tych komórek wskazują, że są one również wrażliwe na zakażenie wirusami paragrypy typu 1 i 2. Najmniejszą wrażliwość na badane wirusy wykazały komórki He-La i FL. Komórki ciągłej linii He-La były znacznie mniej wrażliwe na oba wirusy niż pierwotne komórki nerki małp, różnica miana zakaźnego wynosiła około 4 logarytmów. Podobne wyniki uzyskały Akopowa i Aleksiejewa (1) dla wirusa CA.

Wyniki badań własnych niewątpliwie nie mogą być rozciągnięte na wirusy i szczepy komórek utrzymywane w innych laboratoriach. Hull i Tritch (9) przypuszczają, że te same szczepy komórkowe w poszczególnych laboratoriach ulegają pewnym modyfikacjom w toku ich utrzymywania i propagowania. Pewne zróżnicowanie zaznacza też się wśród poszczególnych szczepów wirusowych nowowyizolowanych i wielokrotnie pasażowanych. Obszerne piśmiennictwo dotyczące namnażania wirusów paragrypy w liniach ciągłych wskazuje, iż namnożenie wirusów w komórkach zależy od typu komórek i indywidualnych właściwości wirusów. Przeprowadzone badania wykazują, że istnieją możliwości szerszego wykorzystania komórek linii ciągłych w badaniach nad wirusami paragrypy.

Na podstawie dostępnego piśmiennictwa stwierdzono, że odczynu zahamowania hemadsorpcji z wirusami paragrypy nie wykonywano dotychczas w hodowli komórek linii ciągłych. Natomiast w toku prowadzonych badań wykonywano kilkakrotnie odczyn zahamowania hemadsorpcji z 1, 2 i 3 typem wirusów paragrypy i z wirusem SV5 w komórkach He-La. Otrzymywano zawsze swoiste zahamowanie hemadsorpcji przy użyciu wirusów w dawce 100 TCID₅₀ i wzorcowych surowic odpornościowych dla szczepów C-39, Greer, C 243 i SV5.

PIŚMIENNICTWO

1. Akopowa I. I., Aleksiejewa A. K.: Wopr. Wirusol. 2, 167—173, 1969.
2. Bukrinskaja A. G.: Wopr. Wirusol. 6, 741—744, 1960.
3. Chanock R. M., Johnson K. M., Cook M. K., Wong D. C., Vargosco A.: Amer. Rev. Resp. Dis. 83, 125—129, 1961.
4. Chanock R. M., Parrott R. H., Johnson K. M., Kapikian A. Z., Bell J. A.: Amer. Rev. Resp. Dis. 88, suppl., 152—166, 1963.
5. Chany C., Daniel Ph., Robbe-Fossat F., Vialatte J., Lépine P., Lelong M.: Ann. Inst. Pasteur 95, 721—731, 1958.
6. Dick E. C., Mogabgab W. J., Holmes B.: Am. J. Hyg. 73, 263—272, 1961.
7. Evans A. S.: New Eng. J. Med. 263, 233—237, 1960.
8. Henry M., Peyron L., Sohier R.: Rev. Hyg. Méd. Soc. 16, 715—752, 1968.

9. Hull R. N., Tritch O. J.: Nat. Cancer Inst. Monograph, 7, 161—169, 1962.
10. Ishida N., Homma M., Osato T., Hinuma Y., Miyamoto T.: Virology 24, 670—672, 1964.
11. Konowałowa N. G., Bliumkin W. N., Zakstielskaja L. Ja.: Wopr. Wirusol. 6, 729—735, 1967.
12. Łuczak M., Korbecki M.: Med. Dośw. Mikrobiol. 21, 77—82, 1969.
13. Petersen K. B.: Acta path. microbiol. scand. 45, 213—224, 1959.
14. Smorodincew A. A. Jr.: Acta Virol. 6, 338—346, 1962.
15. van der Veen J., Sonderkamp H. J. A.: Arch. ges. Virusforsch. 15, 721—734, 1965.
16. Zakstielskaja L. Ja., Fan I-lan: Wopr. Wirusol. 1, 71—79, 1962.

Otrzymano 22.XI.1971.

РЕЗЮМЕ

Получено размножение вирусов парагриппа типа 1 (C-39) и типа 2 (CA) в клетках перевиваемых линий KB, WISH, He-La, FL. На основе величины титра заразительности сравнивались чувствительность изученных сплошных линий и зародышевых клеток почки у обезьян к заражению вирусами парагриппа типа 1 и 2.

Высказывается мысль о возможности проведения реакции задержки гемадсорбции в перевиваемых линиях клеток.

SUMMARY

The multiplication of parainfluenza viruses of type 1 (C-39) and type 2 (CA), in continuous linear cells, KB, WISH, He-La and FL, was obtained.

The sensitivity of continuous linear cells and primary tissue of a monkey kidney to infection by parainfluenza viruses of type 1 and type 2, was compared on the basis of infectivity titers.

It is suggested that the hemadsorption-inhibition test can be carried out in continuous linear cells.