

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVI, 3

SECTIO C

1971

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS  
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Zbigniew KAWECKI, Irena SUJAK

**Badania nad interferencyjnymi właściwościami wirusa kleszczowego  
zapalenia mózgu w miarę adaptacji do hodowli tkankowej**

Исследования интерференционных свойств вируса клещевого энцефалита  
по мере адаптации к тканевой культуре

Investigations on the Interference Properties of Tick-borne Encephalitis  
Virus during Adaptation to Tissue Culture

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu replikuje się w całym szeregu komórek linii ciągłych i tkanek pierwotnych różnego pochodzenia. W hodowlach tkankowych otrzymuje się duże miana wirusa, przewyższające zwykle miana otrzymane na myszkach przy zakażeniu domózgowym. Pomimo że wirus replikuje się w różnych komórkach, nie powodując ich degeneracji, tylko nieliczne prace donoszą o wystąpieniu efektu cytotatycznego pod wpływem szczepu kleszczowego zapalenia mózgu. Między innymi Libikowa (6) w komórkach Hela, Zeipel i Svedmyr (19) w komórkach Detroit 6, Kaweck i (3) w komórkach Girardi obserwowali zmiany cytotatyczne. Dzięki słabym właściwościom cytotatycznym wirusa kleszczowego zapalenia mózgu od wielu lat używa się jako stymulatora interferencji (1, 2, 7). Stwierdzono jednak, że właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu ulegają znacznym wahaniom. Postanowiono więc prześledzić, jak zachowują się różne szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu adaptowanego do myszek w miarę kolejnych pasażów w obranych do badań komórkach.

MATERIAŁY I METODYKA

Wirusy. Do badań użyto wirusów kleszczowego zapalenia mózgu: szczepu K<sub>5</sub> otrzymanego z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku, ilość pasażów szczepu na myszkach nie znana, szczepu Kłodobok 47 — pasaż na myszkach, szczepu Chabarowski 17 — pasaż na myszkach, szczepu Hypr 51 — pasaż na mysz-

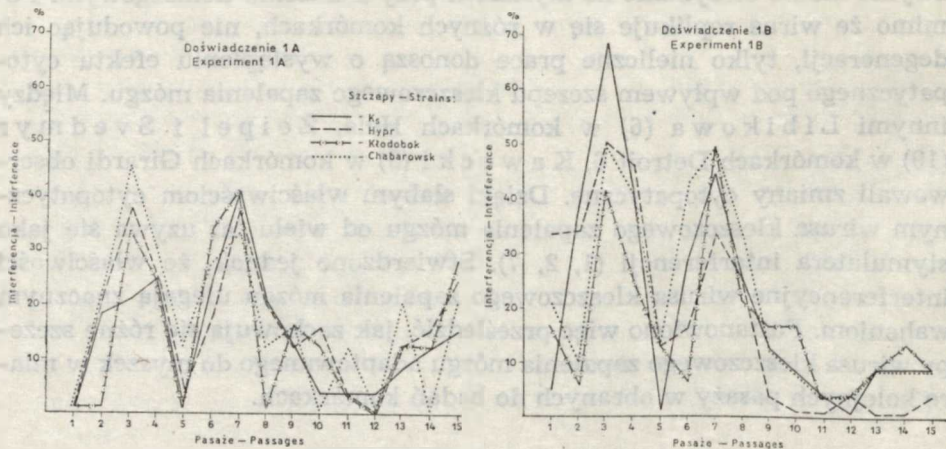
kach. Pierwszy szczep otrzymano z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku, pozostałe trzy szczepy z PZH w Warszawie. Wirusa krowianki izolowano ze szczepionki otrzymanej z Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej w Lublinie.  $TCID_{50}$  wirusa krowianki w hodowli komórek Detroit 6 wynosiło  $10^{-6}$ . Wszystkie szczepy wirusów przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}C$ . Materiałem wyjściowym do badań szczepów wirusa kleszczowego zapalenia mózgu była 10% zawiesina mózgu myszki. Jako inokulum używano 0,1 ml zawiesiny w rozcieńczeniu  $10^{-6}$ . Doświadczenie powtórzono dwukrotnie, wychodząc z mózgu zakażonej myszki. Drugą serię doświadczeń wykonano po 6-miesięcznym przechowywaniu materiału wyjściowego w temp.  $-20^{\circ}C$ .

Tkanki i płyny tkankowe. Doświadczenie wykonano w komórkach Detroit 6, otrzymanych z Katedry Mikrobiologii Farmaceutycznej AM w Gdańsku. Komórki hodowano w płynie Syvertona i Scherera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Do zakażonych hodowli i do rozcieńczeń używano tego samego płynu z 1% surowicy cielęcej.

Metodyka interferencji. Do jednowarstwowej 48-godz. hodowli komórek Detroit 6 dodawano 0,1 ml zawiesiny odpowiedniego szczepu wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Zakażone komórki hodowano 72 godz. w temp.  $37^{\circ}C$ . Następnie dodawano wirusa krowianki w ilości 100  $TCID_{50}$  na zakażoną probówkę i po 48 i 72 godz. określano interferencję, biorąc pod uwagę zahamowanie lub opóźnienie wystąpienia efektu cytopatycznego komórek zakażonych dwoma wirusami w porównaniu z kontrolą, zakażoną tylko wirusem krowianki.

#### WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych badań wynika, że właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu mogą ulegać znacznym wahaniom, wyrażającym się w niektórych przypadkach 2-krotnym, w innych nawet

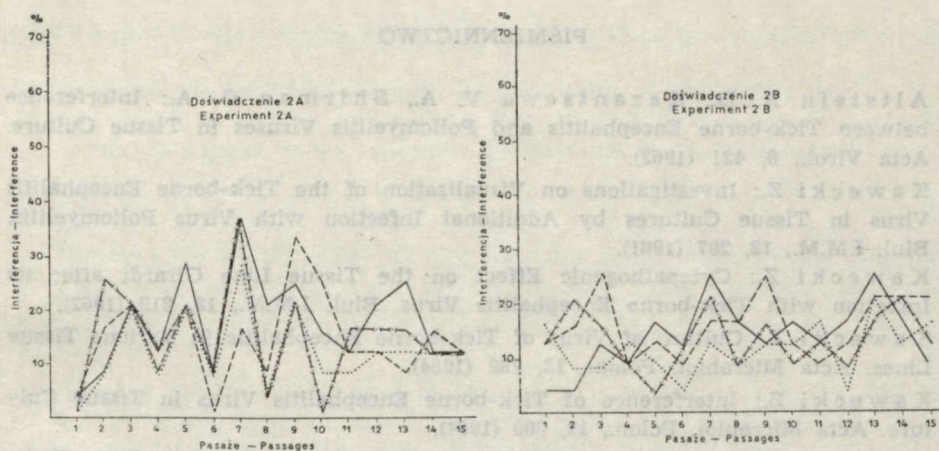


Ryc. 1. Właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu podczas kolejnych pasażów w komórkach Detroit 6; doświadczenie 1 A — po 48 godz., doświadczenie 1 B — po 72 godz.

Interference properties of tick-borne encephalitis virus during successive passages in Detroit 6 cells; experiment 1 A — after 48 hrs, experiment 1 B — after 72 hrs



6-krotnym zwiększeniem lub zmniejszeniem właściwości interferencyjnych. Dla wszystkich czterech szczepów następowała jednoczesna, choć nie taka sama zwyżka lub niżka właściwości interferencyjnych. Co warunkuje takie wahania we właściwościach interferencyjnych wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, nie zostało wyjaśnione. Szczepy wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, pochodzące bezpośrednio z mózgu myszki zakazanej, interferują w pierwszych pasażach dobrze, w następnych ich właściwości interferencyjne ulegają osłabieniu (doświadczenie 1 A). Te same szczepy po 6-miesięcznym przechowywaniu w stanie zamrożenia znacznie słabiej interferują, ale wahania we właściwościach interferencyjnych w poszczególnych pasażach są znacznie mniejsze.



Ryc. 2. Właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu podczas kolejnych pasażów w komórkach Detroit 6; doświadczenie 2 A — po 48 godz., doświadczenie 2 B — po 72 godz.

Interference properties of tick-borne encephalitis virus during successive passages in Detroit 6 cells; experiment 2 A — after 48 hrs, experiment 2 B — after 72 hrs

Z badań K a w e c k i e g o (4, 5) wynika, że wystąpienie najintensywniejszych właściwości cytopatycznych wirusa kleszczowego zapalenia mózgu przypada w czasie bardzo słabych właściwości interferonotwórczych i odwrotnie, silne właściwości interferencyjne wykluczają wystąpienie intensywnych zmian cytopatycznych. Od czego zależy wystąpienie zmian cytopatycznych, a od czego właściwości interferencyjnych, trudno powiedzieć na podstawie dotychczasowych badań.

V i l c e k (7, 8) wykazał, że inaktywowany wirus kleszczowego zapalenia mózgu nie interferuje. Ale z drugiej strony stwierdziliśmy, że w miarę krótkotrwałego przechowywania w chłodni zwiększają się właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, zatem

prawdopodobnie zależą one od wielu czynników związanych z wirusem, środowiskiem i komórką. Badania nad ustaleniem parametrów interferencji stymulowanej wirusem kleszczowego zapalenia mózgu są więc koniecznością warunkującą postęp w dalszych badaniach.

#### WNIOSKI

1. Właściwości interferencyjne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu ulegają znacznym wahaniom.

2. Ustalenie parametrów interferencji stymulowanej wirusem kleszczowego zapalenia mózgu jest warunkiem powodzenia dalszych badań.

#### PIŚMIENICTWO

1. Altstein A. D., Kazantsewa V. A., Shirman G. A.: Interference between Tick-borne Encephalitis and Poliomyelitis Viruses in Tissue Culture. *Acta Virol.*, 6, 421 (1962).
2. Kawecki Z.: Investigations on Visualization of the Tick-borne Encephalitis Virus in Tissue Cultures by Additional Infection with Virus Poliomyelitis. *Biul. I.M.M.*, 12, 207 (1961).
3. Kawecki Z.: Cytopathogenic Effect on the Tissue Line Girardi after its Infection with Tick-borne Encephalitis Virus. *Biul. I.M.M.*, 13, 219 (1962).
4. Kawecki Z.: Culture of Virus of Tick-borne Encephalitis in Various Tissue Lines. *Acta Microbiol. Polon.*, 13, 299 (1964).
5. Kawecki Z.: Interference of Tick-borne Encephalitis Virus in Tissue Culture. *Acta Microbiol. Polon.*, 13, 305 (1964).
6. Libikowa H.: Viruses of the Tick-borne Encephalitis Group in HeLa Cells. *Acta Virol.*, 3 (Supplem.) 41 (1959).
7. Vilcek J.: Studies on an Interferon from Tick-borne Encephalitis Virus-infected Cells, *Acta Virol.*, 5, 278 (1961).
8. Vilcek J.: Studies on an Interferon from Tick-borne Encephalitis Virus-infected Cells. *Acta Virol.*, 7, 107 (1963).
9. Zeipel G., Svedmyr A.: Growth of Viruses of the Russian Spring-summer Louping-ill Group in Tissue Culture. *Arch. ges. Virusforsch.*, 8, 370 (1958).

#### РЕЗЮМЕ

Произвели очередной пассаж в клетках Detroit 6 4 штаммов вируса клещевого энцефалита. Штаммы были адаптированы к мышам. В отдельных пассажах констатировали большое колебание интерференционных свойств исследованных штаммов. В некоторых пассажах интерференционные свойства увеличивались или уменьшались в два раза, в других в шесть раз.

## SUMMARY

Successive passages of four strains of tick-borne encephalitis virus were carried out in Detroit 6 cells. The strains were adapted to mice. Great fluctuations in the interference properties of the examined strains were observed during individual passages. Those properties underwent 2-fold or 6-fold increase or decrease.

SWA-KUBIEC, Tereza; WAJCHER, Eugeniusz; GĄSIOR

Isolation of Soluble Fractions of Phosphoproteins from Bacterial Cells

Isolacja rozpuszczalnych ułamków fosfoproteinów z bakterii

Manuscript received 10.10.1971

Phosphoproteins (P-proteins) are the class of acidic proteins containing phosphate esterified with serine or threonine residues. In some cases phosphate can be linked to -OH- group of imidazole ring of histidine (8).

Phosphoproteins have been isolated from a number of animal tissues as well as from some bacterial species. There are many experimental data regarding the possible biological functions of mammalian phosphoproteins, i.e. stimulation of growth material, oxidative phosphorylation etc. Our knowledge about bacterial phosphoproteins, their localization inside the cell and their function is still obscure. The highest concentration of P-proteins is in the logarithmic phase of growth of bacterial culture and it sharply decreases in culture in approximately 50% of a value in the stationary phase.

These observations might suggest that P-proteins play a specific role in an intensively metabolizing cell and are not the only stored material.

The aim of this paper was to isolate and fractionate phosphoproteins from *E. coli* for chemical characterization. A preliminary account has been reported (9).



