

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

Anna SIDOR-WÓJTOWICZ, Leon JABŁOŃSKI

**Badania nad patogennością wirusa Coxsackie B 6 i jego mutantów
dla mysich osesków**

Исследования патогенности вируса Coxsackie B 6 Schmitt и его мутантов
для мышных сосунков

Investigations on the Pathogenicity of Coxsackie B 6 Virus and its Mutants for
Suckling-mice

Badania nad zmiennością wirusów pod wpływem różnych czynników są jednym z aktualnych problemów współczesnej genetyki. Potrzeba prowadzenia tych badań wynika z konieczności otrzymania osłabionych pod względem zjadliwości szczepów wirusowych do produkcji szczepionek. Wobec braku specyficznej terapii zakażeń wirusowych, stosowanie szczepionek w profilaktyce tych zakażeń jest konieczne. Poznanie procesu otrzymywania zmienionych wirusów była przyczyną dużego zainteresowania się tym zagadnieniem. Wielu autorów wykazało zmienność wirusów zarówno w budowie antygenowej, jak i w cechach biologicznych pod wpływem temperatury. Kirn i wsp. (12) wykazali zmienność u wirusów krowianki, Sokolow i wsp. (17) u wirusów grypy, Jabłoński (8—11) u wirusów ECHO 9 oraz Gevanda u (5—7) u wirusów Coxsackie B 5. Badania autorów (2—4, 13—16) potwierdzają wpływ infraoptymalnych temperatur na zmienność wirusów w szerokim zakresie, a między innymi i zjadliwości wirusów.

Przedstawione w naszej pracy doświadczenia miały na celu zbadanie patogenności dla mysich osesków odmian wirusa Coxsackie B 6 Schmitt, uzyskanych pod wpływem nieoptymalnych temperatur.

MATERIAŁ BADAWCZY

Badania przeprowadzono z wirusami Coxsackie B 6 Schmitt i jego odmianami otrzymanymi w wyniku pasażowania w temperaturze 30° i 40°. Wirusy namnażano w hodowli komórek nerek małych w odpowiednich temperaturach i określano miano metodą Reeda i Muencha. Miano wirusów ustalano na 10⁵ TCID₅₀/ml. Do doświadczeń nad patogennością badanych wirusów użyto 267 osesków białych myszy rasy Swiss oraz 49 osesków, które stanowiły grupę kontrolną.

METODYKA BADAŃ

Przygotowanymi wirusami zakażano domięśniowo (0,02 ml) i domózgowo (0,01 ml) 24 godzinne oseski mysie. Obserwowano je przez 14 dni notując objawy kliniczne. Niektóre oseski z najbardziej nasilonymi objawami porażen mięśniowych usypiano. Po dekapitacji i otwarciu czaszki, jamy brzusznej oraz klatki piersiowej pobierano narządy, które utrwalano w płynie Bouina przez 48—96 godzin. Następnie preparowano mózg, wątrobę, śledzionę oraz mięśnie według metody podanej w pracy Blooma i wsp. (1).

Po odpowiednim przygotowaniu narządów z 53 osesków mysich zakażonych badanymi wirusami reizolowano wirusy w hodowli komórek nerek małych inkubowanych w odpowiednich temperaturach. Narządy przygotowano według metody podanej przez Jabłońskiego (18). Materiał do wykonania preparatów histopatologicznych przygotowywano według metody podanej przez Żulińskiego i wsp. (19). Preparaty histopatologiczne barwiono hematoksyliną i eozyną. Zdjęcia fotograficzne preparatów histopatologicznych wykonywano aparatem Exacta Varex z nasadką obiektywową. Powiększenie wynosi 185 X.

Istotność statystycznie znamienych sprawdzono według testu X^2 dla tablicy czteropolowej 2×2 .

WYNIKI BADAŃ

Zaszczepione oseski mysie obserwowano przez dwa tygodnie i notowano zmiany kliniczne. Zbiorcze wyniki przedstawiono w tabeli 1. Wirusy Coxsackie B 6 Schmitt powodują śmierć wszystkich zakażonych osesków mysich (100%). Niezależnie od drogi zakażenia (domózgowo czy domięśniowo), śmierć osesków występowała po 36—48 godzinach. Porażenia mięśni obserwowano już po 18—24 godzinach.

Tab. 1. Wyniki badań nad patogennością badanych wirusów
The results of investigations on pathogenicity of the examined viruses

Grupa wirusów	Liczba osesków mysich	%	Obserwacje kliniczne								Reizolacja		
			padło		porażone		chore		bez zmian		Liczba badanych	Wyniki dodatnie	
			liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%		liczba	%
1	40	100	40	100	—	—	—	—	—	—	10	10	100
2	70	100	50	71,4	14	20,0	3	4,3	3	4,3	15	11	73
3	55	100	55	100	—	—	—	—	—	—	10	10	100
4	60	100	1	1,7	5	8,3	2	3,3	52	86,7	15	—	—

Objaśnienie (Explanation):

- 1 — wirusy Coxsackie B 6 Schmitt (viruses Coxsackie B 6 Schmitt)
- 2 — wirusy Coxsackie B 6 odmiana 30 (viruses Coxsackie B 6 variant 30)
- 3 — wirusy Coxsackie B 6 odmiana 37 (viruses Coxsackie B 6 variant 37)
- 4 — wirusy Coxsackie B 6 odmiana 40 (viruses Coxsackie B 6 variant 40)

W badaniach histopatologicznych mózgu wykazano następujące zmiany (ryc. 1): Opona miękka wyraźnie przekrwiona, ponadto odcinkowo podminowana nagromadzonym surowiczym wysiękiem zapalnym. W miejscach nacieczonych wysiękiem surowiczym zaznaczony był wzmożony odczyn histiocytarny w postaci powiększenia i rozplemu komórek jednojądrzastych. Śródbłonek naczyń krwionośnych był na ogół obrzękły, a na obwodzie naczyń dostrzegano niekiedy nieznaczny rozplem komórek przydanki. Aktywność komórek naczyńniowych oraz mikrogleju w tkance nerwowej była bardzo słaba. Tkanka nerwowa podoponowa nieco rozluźniona. W mięśniach nieznaczny rozplem komórek jednojądrzastych wokół naczyń krwionośnych.

Badania nad reizolacją wirusów z narządów przeprowadzono u 10 oseków mysich. Wirusy izolowano z mózgu 6 oseków, u 4 oseków z mięśni oraz z wątroby i jelit u 3 i 4 oseków. Odmiana wirusów Coxsackie B 6 30 powodowała śmierć 50 (71,4%) oseków mysich spośród 70 zakażonych. U 14 obserwowano porażenia, 3 oseski były chore, a 3 nie wykazywały żadnych zmian. Na 15 badanych oseków wirusy reizolowano z mózgu u 6 oseków, mięśni u 1 oseska, z wątroby u 3 oseków i u jednego z jelit. Oseski zakażone tym szczepem wirusa padały po 48—96 godzinach od zakażenia. Pierwsze objawy porażenia zauważono po 48 godzinach. Przebiegały one podobnie jak po zakażeniu szczepem prototypowym. Oseski, które przeżyły zakażenie rozwijały się wolniej od kontrolnych. Wzrost ich był wolniejszy, sierść bardzo rzadka, a pojawianie się jej stwierdzano bardzo późno. Po 14 dniach były one o połowę mniejsze wagowo.

Wyniki badań histopatologicznych przedstawia ryc. 2. Widoczne wyraźne przekrwienie opony miękkiej. Odcinkowe nagromadzenie wysięku surowiczego, podminowującego oponę. Zmianom wysiękowym towarzyszył rozplem komórek histiocytarnych oraz obrzęk śródbłonka naczyniowego. W tkance nerwowej komórki mikrogleju wykazywały niewielkie oznaki aktywności. W mięśniach natomiast stwierdzono rozlane nacieczenia tkanki śródmiąższowej komórkami jednojądrzastymi, wśród których występowały pojedyncze granulocyty. Wzmożony odczyn komórkowy dotyczył również naczyń krwionośnych (ryc. 3).

Wirusy odmiany 37 powodowały śmierć wszystkich zakażonych (55 oseków) oseków mysich. Zmiany histopatologiczne były bardzo zbliżone do zmian wywoływanych przez szczep prototypowy. Wirusy izolowano z mózgu, wątroby i jelit zakażonych oseków mysich. Odmiana wirusów Coxsackie B 6 40 powodowała (w jednym przypadku na 60) śmierć zakażonego oseska. U 5 oseków dawała porażenie, a dwa

oseski były chore. U pozostałych 52 osesków zakażonych nie stwierdzono żadnych objawów klinicznych. Nie izolowano również wirusów z badanych narządów.

W badaniach histopatologicznych stwierdzono zmiany o mniejszym nasileniu jak przedstawiono poprzednio. Przekrwienie opony miękkiej mózgu było niewielkiego stopnia. Odcinkowe nagromadzenie niewielkiej ilości wysięku surowiczego, któremu towarzyszył niewielki odczyn komórkowy (komórek jednojądrzastych). Tkanka nerwowa pod oponą wykazywała nieco luźniejsze utkanie. W mięśniach wzmożony odczyn komórkowy w tkance śródmiąższowej w pobliżu naczyń krwionośnych (ryc. 4). W wątrobie i śledzionie u badanych osesków nie stwierdzono zmian histopatologicznych po zakażeniu badanymi wirusami. W preparatach histopatologicznych sporządzonych z mózgu, wątroby, mięśni i śledziony osesków nie zakażonych barwionych hematoksyliną i eozyną zmian histopatologicznych nie stwierdzono. W wątrobie zachowany był czynny układ krwiotwórczy.

W wysoce istotny statystycznie sposób w patogenności dla osesków mysich różni się odmiana wirusów Coxsackie B 6 30 ($\chi^2=20,62$, $P \geq 0,001$) od wirusów odmiany 40 ($\chi^2=55,21$, $P \geq 0,001$). Porównanie właściwości patogennych pozostałych badanych wirusów przy pomocy obliczeń statystycznych miałyby charakter losowy, wyniki badań są zbliżone.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Otrzymane przez S a b i n a (16) atenuowane szczepy *poliomyelitis* charakteryzują się zdolnością wzrostu w temperaturze 25° i są niepatogenne. L w o f f (15) uzyskał wyselekcjonowany szczep polio typ 2 MEF₁ zaadaptowany do noworodków mysich, który namnażał się dobrze w komórkach KB w 40° i był słabo wirulentny dla małąp dając zmiany w mózgu bez paraliżu. Uzyskanie szczepu MEF₁ o braku cech neurowirulentnych, rct₄₀₊ jest dotychczas niewyjaśnione zwłaszcza gdy badania mutantów poliowirusów wykazują, że cechy genetyczne rct₄₀₊ i neurowirulencja są ściśle związane. Przedstawione wyniki badań są odmienne od wyników uzyskanych przez S a b i n a (16), D u b e s a i wsp. (2), G e n d o n a (3,4), G e v a n d a u (5—7) i innych. Zgodne są z badaniami L w o f f a (15) przeprowadzonych ze szczepem MEF₁.

W badaniach nad wirusami *poliomyelitis*, ECHO, Coxsackie, grypy i innymi (2, 6, 9, 14, 15) wykazano, że odmiany „zimne” tracą swoje właściwości patogenne. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że odmiana „zimna” jest patogenna dla osesków mysich tak jak szczep prototypowy. Inne odmiany są mniej lub niepatogenne dla osesków.

Wnioski

1. Z przeprowadzonych badań wynika, że wirusy Coxsackie B 6 Schmitt pasażowane w temperaturze 30° są patogenne dla wrażliwych osesków mysich.

2. Odmiana „gorąca” tego szczepu utraciła patogenność dla osesków mysich pod wpływem pasażowania w temperaturze 40°.

3. Pasażowanie szczepu prototypowego w temperaturze 37° nie wpływa na zmianę patogenności tego wirusa.

PIŚMIENNICTWO

1. Bloom W., Fawcett D. W.: A textbook of histology, Philadelphia, London, W. B. Saunders Com. 1962.
2. Dubes G. R., Chapin M.: Science 124, 586—587, 1956.
3. Gendon J. Z.: Acta Virol. 7, 16—18, 1963.
4. Gendon J. Z., Marczienko A. T.: Genetyka 5, 110—118, 1966.
5. Gevandau P., Charrel J., Sautet G.: Compt. Rend. Soc. Biol. 3, 705—708, 1965.
6. Gevandau P., Charrel J.: Compt. Rend. Soc. Biol. 4, 820—826, 1966.
7. Gevandau P., Charrel J.: Compt. Rend. Soc. Biol. 1, 139—141, 1966.
8. Jabłoński L.: Med. Dośw. Mikrobiol. 18, 61—66, 1966.
9. Jabłoński L.: Med. Dośw. Mikrobiol. 20, 55—61, 1968.
10. Jabłoński L.: Med. Dośw. Mikrobiol. 20, 191—194, 1968.
11. Jabłoński L., Grzybek D., Bakalczuk A.: Med. Dośw. Mikrobiol. 20, 305—308, 1968.
12. Kirn A., Braunwald I.: Ann. Inst. Pasteura 3, 427—431, 1964.
13. Lwoff A., Lwoff M.: Compt. Rend. Acad. Sci. 246, 190—195, 1958.
14. Lwoff A., Lwoff M.: Compt. Rend. Acad. Sci. 248, 1725—1729, 1959.
15. Lwoff A., Horne R., Tourner P.: Cold. Spr. Harb. Symp. Quand. Biol. 28, 159—172, 1962.
16. Sabin A. B.: Perspect. Vir. vol. II. Pollard ed Minneapolis, Burges Publ. 90—110, 1961.
17. Sokołow M. J., Łozińska T. M.: Wopr. Wirusol. 6, 692—698, 1963.
18. Wirusologia Lekarska. PZWL, Warszawa 1969.
19. Żuliński T., Rubaj B., Zioło T.: Ogólna anatomia patologiczna zwierząt domowych. PZWL, Warszawa 1969.

Otrzymano 20 IV 1970.

OBJAŚNIENIA FOTOGRAFII

Ryc. 1. Zmiany histopatologiczne w mózgu osesków mysich zakażonych wirusem Coxsackie B 6 Schmitt.

Ryc. 2. Zmiany histopatologiczne w mózgu osesków mysich zakażonych wirusem Coxsackie B 6 30.

Рис. 3. Zmiany histopatologiczne w mięśniach oseków mysich zakażonych wirusem Coxsackie B 6 30.

Рис. 4. Zmiany histopatologiczne w mięśniach oseków mysich zakażonych wirusem Coxsackie B 6 40.

РЕЗЮМЕ

Сравнительные исследования мутантов, полученных от прототипа штамма Coxsackie B 6, показали, что этот штамм и „холодный” мутант обладают патогенностью для мышных сосунков. „Горячий” мутант потерял патогенность. При гистопатологических исследованиях внутренних органов сосунков констатировали изменения в мышцах и мозгу. Исследования показали, что при пассаже вируса Coxsackie B 6 при повышенной температуре (40°) он теряет патогенность для мышных сосунков.

SUMMARY

Comparative studies of mutants derived from a prototype Coxsackie B 6 virus showed that the parent strain and its "cold" mutant are pathogenic for suckling-mice while the "hot" mutant does not show any pathogenicity towards the animals tested.

Histopathological preparations of organs showed the changes in muscles and brain. The present results indicate that Coxsackie B 6 virus loses its pathogenicity for suckling-mice during incubation at a higher temperature (40°).

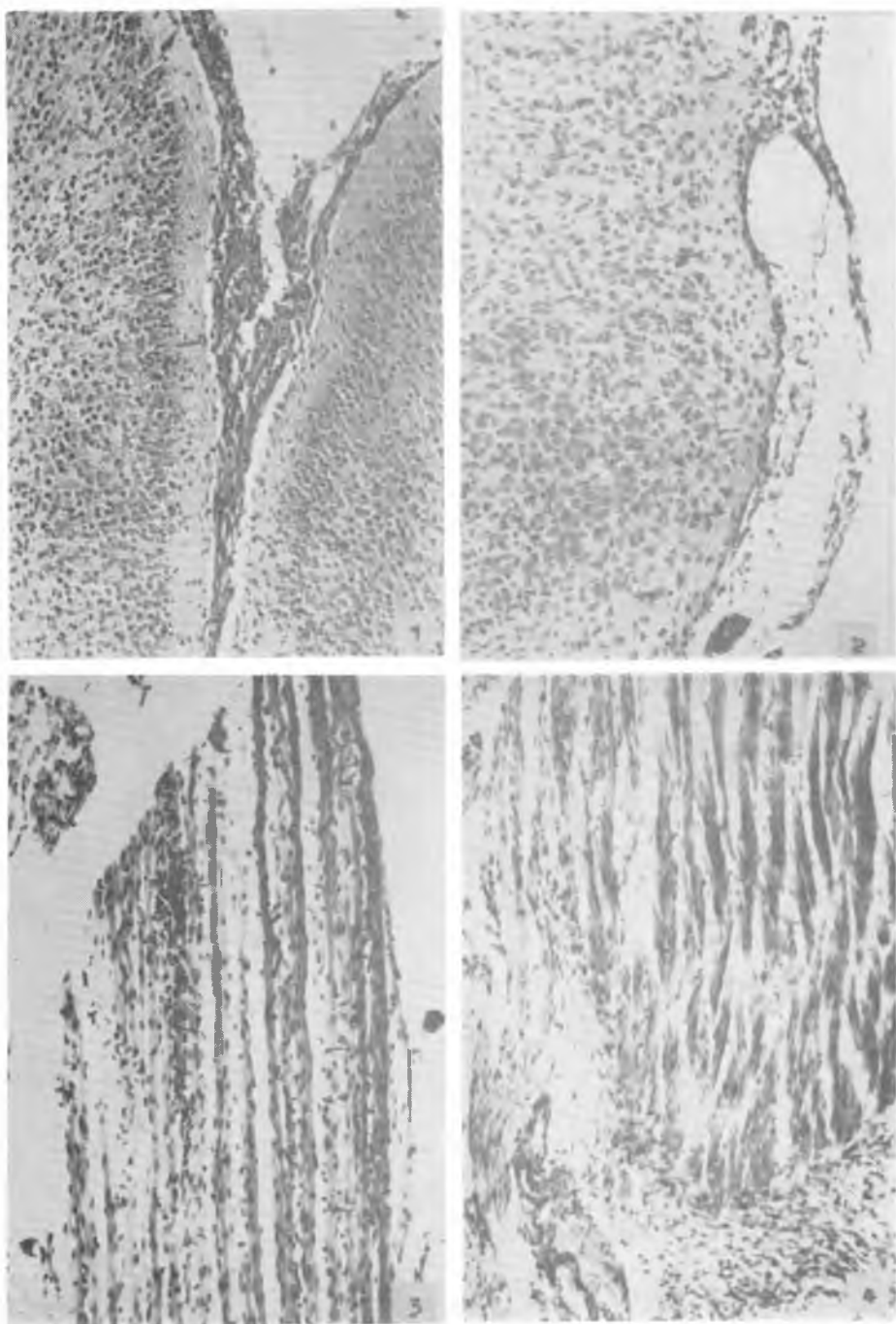
EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Histopathologic changes in the brain of suckling-mice infected with Coxsackie B 6 Schmitt virus.

Fig. 2. Histopathologic changes in the brain of suckling-mice infected with the virus Coxsackie B 6 30.

Fig. 3. Histopathologic changes in the muscles of suckling-mice infected with the virus Coxsackie B 6 30.

Fig. 4. Histopathologic changes in the muscles of suckling-mice infected with the virus Coxsackie B 6 40.



Anna Sidor-Wójtowicz, Leon Jabłoński

