

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXIV, 17

SECTIO D

1969

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
p. o. Kierownik: doc. dr med. Leon Jabłoński

Anna SIDOR-WÓJTOWICZ, Leon JABŁOŃSKI

**Wpływ nieoptymalnych temperatur na właściwości biologiczne  
wirusów ECHO 9, ECHO 6 i Coxackie B<sub>6</sub>**

Влияние неоптимальных температур на биологические свойства  
вирусов ECHO 9, ECHO 6 и Coxackie B<sub>6</sub>

The Influence of Non-optimal Temperatures on Biological Properties  
of Virus Strains ECHO 9, ECHO 6, and Coxackie B<sub>6</sub>

Wirusy zwierzęce namnażają się w zakresie temperatur zbliżonych do ciepłoty ciała ssaków. Temperatury wyższe (superoptymalne) lub niższe (infraoptymalne) działające podczas poszczególnych faz cyklu rozwojowego wirusa mają wpływ na właściwości biologiczne nowo powstających cząsteczek. Znaczna liczba badaczy stoi na stanowisku, że zmiany zachodzące w kodzie genetycznym wirusa są bezkierunkowe, a podwyższona, względnie obniżona temperatura działa selekcyjnie i sprzyja rozmnażaniu się tych cząsteczek, które są bardziej przystosowane do aktualnego środowiska (5, 11).

Wpływem zmienionym temperatur na rozwój wirusa (*in vitro*) interesowało się niewielu badaczy (1, 3, 6, 12). Teoretyczne rozważania nad wpływem temperatury na cykl rozwojowy wirusa opublikował L w o f f (11). Praktycznie, zmienioną temperaturę, najczęściej obniżoną, stosowano celem atenuacji wirusów, które następnie używano do szczepień. S a b i n (16) zastosował obniżoną temperaturę do wyosobnienia niepatogennych poliovirusów. Inni badacze (1, 2, 3, 10, 12) wykazali, że pasażowanie wirusów w obniżonej temperaturze ma duży wpływ na szereg cech genetycznych wirusów, a szczególnie na zjadliwość wirusa, która ulega znacznemu obniżeniu.

W naszej pracy przedstawiamy badania nad wpływem super- i infraoptymalnej temperatury zastosowanej podczas pasażowania wirusów: wirus ECHO 9, wirus ECHO 6 i wirus Coxackie B<sub>6</sub>.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badania użyto szczepów prototypowych wirusa ECHO 9 (Hill) i ECHO 6 (D'A m o r i), otrzymanych z Zakładu Wirusologii PZH, oraz szczepu wirusa Coxac-

kie B<sub>6</sub> (Schmitt) otrzymanego z National Institutes of Health, Bethesda, USA. Przed rozpoczęciem pasażowania populacje wirusa ujednolicono metodą trzykrotnych krańcowych rozcieńczeń. Tak otrzymaną populację wirusa nazwano szczepem wyjściowym.

Szczepy wyjściowe wymienionych wirusów pasażowano w pierwotnej hodowli komórek nerek małp *Macacus rhesus* (ECHO 9 i ECHO 6) i *Cercopithecus aetiops* (szczep Coxackie B<sub>6</sub>). Pasażowanie przeprowadzono równolegle w trzech temperaturach w  $30 \pm 0,5$ ,  $36 \pm 0,5$ ,  $40 \pm 0,3^\circ$ . Pasaże wykonano przeciętnie co pięć dni. Z próbówki do próbówki przenoszono od 1000 do 5000 TCID<sub>50</sub> każdego szczepu. W ten sposób wykonano po 25 pasaży. W czasie pasażowania co 5—8 pasaży wykonywano odczyn neutralizacyjny z surowicą homologiczną celem stwierdzenia obecności badanego wirusa.

Po ukończeniu pasażowania otrzymano trzy odmiany każdego szczepu wyjściowego, to jest szczep pasażowany 25 razy w temp.  $40^\circ$ ; szczep pasażowany 25 razy w  $30^\circ$  i — jako kontrola wpływu liczby pasaży na populację — szczep pasażowany w  $36^\circ$ . Celem otrzymania jednorodnych populacji odmian szczepów poddano je ponownie trzykrotnemu przesianiu metodą krańcowych rozcieńczeń. Następnie każdy ze szczepów przebadano, czy wykazuje właściwości charakterystyczne dla enterowirusów. Badano:

1. Wrażliwość na działanie eteru wg metody opisanej przez Melnicka (14).
2. Stabilizację kationami na działanie temp.  $50^\circ$  przez godzinę, wg metody podanej przez Melnicka (14).
3. Oporność na działanie obniżonego pH wg metody opisanej przez Kettera i współprac. (9).

Otrzymane odmiany wirusów poddano badaniu na wzrost w różnych temperaturach. Badano cechę  $rct_{40}$ ,  $rct_{30}$  i  $rct_{36}$ . Do trzech próbek dodawano po 100 TCID<sub>50</sub> badanego szczepu i następnie umieszczano po jednej próbówce w temperaturze  $30^\circ$ ,  $36^\circ$ ,  $40^\circ$ . Po czterech dniach inkubacji oglądano i opisywano zmiany degeneracyjne w warstwie hodowli komórek oraz przeprowadzano mianowanie szczepu. Mianowanie wszystkich szczepów przeprowadzono metodą Reeda i Muencha.

Celem zbadania wpływu temperatury superoptymalnej i infraoptymalnej na cechy patogenetyczne populacji wirusa, zakażono 24 godz. oeski myszek rasy Swiss. Myszkom wstrzykiwano domięśniowo lub domózgowo 0,01 ml wirusa. Miano wirusa wynosiło powyżej  $10^5$  TCID<sub>50</sub> na ml. Myszkę obserwowano przez 10 dni. Jako kontroli użyto myszek niezakażonych lub wstrzykiwano myszkom analogiczne objętości płynu fizjologicznego. Dla kontroli namnażania się wirusów w mięśniach lub w mózgu oseków wykonywano reizolację wirusa w hodowlach komórek nerek małp.

Do badania wirusa ECHO 9 i jego odmian użyto 225 oseków mysich. Do badania wirusa Coxackie B<sub>6</sub> i jego odmian użyto 102 oseków mysich.

Wirus ECHO 6 i jego odmiany nie działały patogennie na mysie oeski. Badano wrażliwość różnych linii komórek na zakażenie badanym szczepem. Użyto hodowli komórek nerek małp *Cercopithecus aetiops*, hodowle komórek tarczycy ludzkiej, której metodę otrzymywania opisano w innych pracach (7, 8), komórki linii Fl, komórki linii HeLa, które pasażowano wg metod opisanych przez Polną (15).

#### WYNIKI BADAŃ

Badania właściwości fizyko-chemicznych wykazały, że szczepy należą do enterowirusów, tzn. odporne są na działanie eteru, stabilizują się kationami w  $50^\circ$  przez 1 godzinę, odporne są na działanie pH 3,0. Wzrost

poszczególnych szczepów w odpowiednich temperaturach przedstawiono na tab. 1.

Tab. 1. Wzrost poszczególnych szczepów w różnych temperaturach  
Growth of several strains at different temperature

Nazwa szczepu	T e m p e r a t u r a		
	30°	36°	40°
ECHO 9 — wyjściowy	±	+	±
ECHO 9 — 25/36	±	+	+
ECHO 9 — 25/40	—	+	+
ECHO 9 — 25/30	+	+	—
ECHO 6 — wyjściowy	±	+	±
ECHO 6 — 25/36	±	+	+
ECHO 6 — 25/40	—	+	+
ECHO 6 — 25/30	+	+	—
Cox B <sub>6</sub> — wyjściowy	±	+	±
Cox B <sub>6</sub> — 25/36	±	+	+
Cox B <sub>6</sub> — 25/40	—	+	+
Cox B <sub>6</sub> — 25/30	+	+	—

Objaśnienia:

- + — dobry wzrost szczepu (CPE +++, miano szczepu ok. 10<sup>6,0</sup>).
- ± — słaby wzrost szczepu (CPE +, miano szczepu ok. 10<sup>3,0</sup>).
- — szczep nie rośnie (CPE —, miano szczepu 10°).

Z tab. 1 wynika, że szczepy pasażowane w 40° posiadają cechę rct<sub>30</sub>—, a szczepy pasażowane w 30° posiadają cechę rct<sub>40</sub>—.

Obserwacje zakażonych osesków mysich wskazywały, że szczep ECHO 9 i jego odmiana „gorąca” na 4—5 dzień od zakażenia powodowały zmniejszoną aktywność ruchową, zasinienie i pomarszczenie skóry i niedowład. Oseski te oznaczono jako chore. Na 5—6 dzień od zakażenia występowały wiotkie porażenia stopy prawej lub lewej, czasem porażenia wiotkie mięśni łądźwi i pośladków. Niektóre oseski padały w czasie 4—7 dnia od zakażenia. Z narządów wewnętrznych tych osesków reizolowano wirusa ECHO 9 lub jego odmianę „gorącą”. Na szczególne podkreślenie zasługuje to, że mutant „zimny” nie wywołał dostrzegalnych objawów chorobowych u zakażonych osesków. Wirusa nie udało się reizolować od zakażonych osesków.

Mechanizm patogennego działania wirusa Coxackie B<sub>6</sub> był odmienny niż wirus ECHO 9. W 2—3 dni od zakażenia wszystkie oseski chorowały

wykazując najczęściej objawy porażen spastycznych kończyn tylnych. Wszystkie oseski padały 3—4 dzień od zakażenia. Z narządów wewnętrznych udawało się stale reizolować wirus. Mutanta „gorącego” nie badano. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że oseski mysie zakażone mutantem „zimnym” nie wykazywały uchwytnych objawów chorobowych.

Szczep wirusa ECHO 6 oraz jego odmiany nie działają patogennie na mysie oseski i inne zwierzęta doświadczalne, dlatego nie można było przeprowadzić badań porównawczych.

Na tab. 2 w sposób przeglądowny przedstawiono działanie szczepów na mysie oseski.

Tab. 2. Patogenne działanie badanych szczepów na mysie oseski

Pathogenic action of the examined strains on suckling mice

Szczep	Zachorowanie	Śmiertelność
ECHO 9 — wyjściowy	+	±
ECHO 9 — 25/36	+	±
ECHO 9 — 25/40	+	+
ECHO 9 — 25/30	—	—
Cox B <sub>6</sub> — wyjściowy	+	+
Cox B <sub>6</sub> — 25/36	+	+
Cox B <sub>6</sub> — 25/40	n i e b a d a n o	—
Cox B <sub>6</sub> — 25/30	—	—
ECHO 6 — wyjściowy	—	—
ECHO 6 — 25/36	—	—
ECHO 6 — 25/40	—	—
ECHO 6 — 25/30	—	—

Objaśnienia:

- + — oseski chorowały i padały
- — oseski nie chorowały i nie padały
- ± — część osesków padła

Na tab. 3 w sposób skrócony przedstawiono wzrost szczepów na różnych liniach komórek. Szczepy wyjściowe i ich odmiany nie wykazywały różnic w działaniu na linię komórek. Na linii HeLa szczepy nie rosły. Wirus Coxackie B<sub>6</sub> nie rósł na komórkach z tarczycy ludzkiej, bardzo słabo namnażał się na linii komórek Fl. Z tab. 3 wynika, że linie komórkowe nie są przydatne do różnicowania odmian od szczepów wyjściowych.

Tab. 3. Wzrost wirusów na różnych liniach komórek  
Growth of viruses on different cell lines

Wirus	H o d o w l a k o m ó r e k			
	nerek mały	tarczycy ludzkiej	F1	HeLa
ECHO 9	+	+	+	—
ECHO 6	+	+	+	—
Cox B <sub>6</sub>	+	—	±	—

Objaśnienia:

- — szczep nie rośnie
- + — szczep rośnie
- ± — szczep rośnie słabo

### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Działaniem podwyższonej i obniżonej temperatury na właściwości biologiczne wirusów interesowało się szereg badaczy. Burnet (2) pierwszy wykazał, że wirus grypy typu A powoduje uszkodzenie i śmierć zarodków kurzych w 36°. Hodując zakażone zarodki kurze w 39° nie stwierdził charakterystycznych zmian. Świadczyło to, że podwyższona temperatura hamowała namnażanie się wirusa typu A. D u b e s i C h a p l i n (3) pierwsi stwierdzili, że cecha wzrostu w odpowiedniej temperaturze jest genetycznie związana z cechą zjadliwości wirusów *poliomyelitis*. Badania te zostały następnie rozszerzone przez S a b i n a i L w o f f a (11, 16). Okazało się, że szczepy dzikie poliovirusów rosną w temperaturze 40°, a szczepy atenuowane w tej temperaturze nie namnażają się. B o u n d r e a u l t i P a v i l a n i s (1) wykazali, że szczepy grypy pasażowane w 41° uzjadliwiają się; szczepy pasażowane w 29° wpływają na komórki gospodarza tak, że wytwarzają one większe ilości interferonu. Przy pomocy pasażowania szczepów grypy w temperaturze 28 i 32°, Ł o z i Ń s k a i w s p ó l p r a c. (12) otrzymali mutanty niezjadliwe dla myszy. Pasażując szczep krowianki w obniżonej temperaturze, K i r n i B r a u n w a l d (10) otrzymali mutanty pozbawione zjadliwości dla kurzych zarodków. L w o f f (11) badał wpływ podwyższonej i obniżonej temperatury na poszczególne fazy cyklu rozwojowego wirusa i doszedł on do wniosku, że zmiana cech wirusa może zależeć od zaburzeń syntezy wirusowej RNA — polimerazy.

Z genetycznego punktu widzenia mutanty badanych szczepów mogły pojawiać się w naszych doświadczeniach na skutek działania warunków sprzyjających mutacji spontanicznej, działania mechanizmu populacyjnej selekcji oraz mechanizmu adaptacji fenotypowej. Za pomocą metody krańcowych rozcieńczeń, zastosowanej przy otrzymywaniu szczepu wyjściowego jak i po ukończeniu pasażowania każdej odmiany, staraliśmy się, by wykluczyć mechanizmy adaptacji fenotypowej i populacyjnej selekcji. Z praktycznego punktu widzenia rodzaj mechanizmu biologicznego ma drugorzędne znaczenie. Ważne jest, że za pomocą nieoptymalnych temperatur otrzymano mutanty badanych szczepów, które różnią się dwoma cechami genetycznymi od szczepu wyjściowego. Mutanty „zimne” nie

rozmnażają się w temperaturze 40°, co upodobnia je do atenuowanych poliovirusów (3, 16).

Można przyjąć, że w czasie pasażowania badanych szczepów w jednej lub kilku cząsteczkach miała miejsce mutacja spontaniczna, a obniżona lub podwyższona temperatura była „biologicznym sitem”, które sprzyjało rozwojowi populacji o nowych cechach genetycznych.

Badania nad patogennością wirusa ECHO 9 potwierdzają spostrzeżenia Eggersa i Sabina (4). W naszych badaniach szczep wyjściowy nie miał ustalonej patogenności. Nasilenie patogenności zależało od wielu nie zawsze uchwytanych czynników. Ocena patogennego działania wyjściowego szczepu Coxackie B<sub>6</sub> wskazuje, że jest on silnie patogenny, mimo że posiada szereg cech biologicznych odróżniających go od pięciu pozostałych typów serologicznych Coxackie B (6).

Z przedstawionej pracy wynika, że obniżona temperatura działa na populacje wirusa ECHO i Coxackie, podobnie jak na poliovirusy, wirusy grypy i inne (5, 12, 16). Miało miejsce zjawisko atenuacji szczepów.

#### WNIOSKI

1. Nieoptymalne temperatury (30°, 40°) stosowane podczas pasażowania powodują powstawanie mutantów o nowych cechach genetycznych.
2. „Zimne” mutanty wirusa ECHO 9, ECHO 6 i Coxackie B<sub>6</sub> posiadają cechę  $rct_{40-}$ , oraz są niepatogenne dla mysich osesków.
3. Mutanty „gorące” 3 badanych wirusów posiadają cechę genetyczną  $rct_{30-}$ .

#### PIŚMIENNICTWO

1. Boundreault A., Pavilanis V.: *Rev. Canad. Biol.* **23**, 253, 1964.
2. Burnet F. M., Bull D. R.: *Austr. J. Exptl. Biol.* **21**, 55—69, 1943.
3. Dubes G. R., Chaplin M.: *Science* **124**, 586, 1956.
4. Eggers H. J., Sabin A. B.: *J. Exp. Med.* **110**, 951—967, 1959.
5. Fenner F., Sambrook J. F.: *Ann. Rev. Microbiol.* **18**, 47, 1964.
6. Jabłoński L.: *Post. Mikrobiol.* **4**, 381—394, 1965.
7. Jabłoński L.: *Experim. Med. Microbiol.* **18**, 61—66, 1966.
8. Jabłoński L., Grzybek D.: *Med. Dośw. Mikrobiol.* (w druku), 1968.
9. Ketler A., Hamparian V. V., Hilleman M. R.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **110**, 82—86, 1962.
10. Kirn A., Braunwald J.: *Ann. Inst. Past.* **106**, 427, 1964.
11. Lwoff A.: *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **27**, 159, 1962.
12. Łozińska T. M., Sokołow M. I., Dawydowa A. A.: *Wopr. Wirusol.* **4**, 436—439, 1965.
13. Margalith M., Margalith E., Rannon L., Goldblum T., Leventon-Kriss S., Goldblum N.: *Arch. Ges. Virusforsch.* **21**, 403, 1967.
14. Melnick J. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **101**, 331—342, 1962.

15. Polna I.: Zarys Wirusologii Praktycznej, str. 55 PZWL, Warszawa 1953.
16. Sabin A. B.: Perspectives in Virology, vol. II, str. 90—110. Burgess Publ. Co., Minneapolis 1961.

Otrzymano 12 XI 1962.

### РЕЗЮМЕ

Штаммы вирусов ECHO 9 (Hill), ECHO 6 (D'Amori) и Сохаские B<sub>6</sub> (Schmitt) пассажировали в температурах 40°, 30°, 36°. В культуре клеток почек обезьян *Cercopithecus aetiops*, *Macacus rhesus* провели по 25 пассажей. Получили 3 варианта исходного штамма — пассажированные штаммы 25/30, 25/40, 25/36.

Исследовали генетический признак *rct* и патогенность для мышат-сосунков. Установлено, что „холодные” мутанты обладают генетическим признаком *rct*<sub>40</sub>— и не являются патогенным для мышат-сосунков; „горячие” мутанты обладают генетическим признаком *rct*<sub>30</sub>—.

Авторы считают, что применение неоптимальных температур во время пассажирования приводит к возникновению новых мутантов вирусов ECHO и Сохаские.

### S U M M A R Y

Virus strains ECHO 9 (Hill), ECHO 6 (D'Amori), Coxackie B<sub>6</sub> (Schmitt) were passaged at 40°, 30°, 36°. Twenty five passages were performed in *Cercopithecus aetiops* and *Macacus rhesus* kidney tissue culture. Three variations (25/30, 25/40, 25/36) of the prototypic strain were obtained.

The *rct* genetic marked and the pathogenicity for suckling mice were determined. It was found that "cold" mutants possess the genetic marker *rct*<sub>40</sub>— and are not pathogenic for suckling mice: "hot" mutants possess the genetic marker *rct*<sub>30</sub>—.

The authors are of the opinion that not-optimal temperatures during virus passages could be the cause of a generation of new ECHO and Coxackie varieties.

