

Biologické vlastnosti viru I. O. vepřů kultivovaného na tkáňových kulturách stabilní linie epithelu vepřových ledvinných buněk (kmen PK)

Биологические свойства вируса инфекционного энцефаломиелита свиней, культивированного на тканевых культурах стабильной линии эпителия почечных клеток свиней (штамм PK)

Die biologischen Eigenschaften des auf Gewebskulturen einer stabilen Linie von Nierenepithelzellen von Schweinen (Stamm PK) gezüchteten Virus der ansteckenden Schweinelähme (AS)

Bohuslav KORYCH, František PATOČKA, Jan HOŘEJŠÍ, Vladimír KUBELKA

Za technické spolupráce R. Štejfy

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a immunologii K. U. v Praze

Laboratoř pro proteosyntézu K. U. v Praze

Došlo dne 3. X. 1960

Úvod

Možnost kultivace viru I. O. vepřů na tkáňových kulturách byla uvedena poprvé L a r s k i m na kulturách Maitlandova typu (1) a brzy potom následovala řada sdělení, zabývajících se možností kultivace tohoto viru na tkáňových kulturách jednovrstevného epithelu vepřových ledvin a produkci specifického cytopathogenního efektu (2-5) i studiem vlastností viru na daném tkáňovém substrátu (6-9).

Tato práce se zabývá studiem morfologické reakce buněk stabilní linie epithelu vepřových ledvin, infikovaných virem I. O. vepřů a porovnáním časných morfologických změn pozorovaných fázovým kontrastem s intracellulární produkcií viru, sledovanou metodou fluorescenčních protilátek.

Materiál a metody

Virus: V pokusech bylo užito viru I. O. vepřů kmen Praha z 12. tkáňové pasáže. Virus před pasážováním na tkáňových kulturách prošel více než 100 i. c. pasážemi na veprích.

Tkáňové kultury: Bylo použito stabilní linie epithelu vepřových ledvinných buněk kmen PK v rozmezí 50 – 75 pasáže. Buňky byly získány při přile-

žitosti Stockholmského kongresu r. 1958 ve 22. pasáži. Kultura byla udržována subkultivací trypsinizační procedurou v kultivačním mediu složeném z 0,5% laktalbuminhydrolyzátu v Earlově nárazníkovém roztoku a 10% telecího séra (10). Pro studium změn pozorovaných fázovým kontrastem a fluorescenčním mikroskopem byly připravovány kultury na krycích sklíčkách pro Buerkerovy komůrky v Petriho miskách o průměru 6 cm. Buněčná suspenze byla pipetována v množství 5 ml s celkovým počtem 500.000 živých elementů na jednu Petriho misku. Pro fluorescenční mikroskopii byly užívány sklíčkové kultury s konfluentním růstem, pro sledování změn ve fázovém kontrastu kultury s ostrůvkovitým růstem buněk pro lepší přehlednost zorného pole.

I n f e k c e k u l t u r : Infekce kultur byla prováděna po propláchnutí Hanksovým nárazníkovým roztokem příslušným počtem tkáňových infekčních dávek viru ($TCID_{50}$) a kultivační medium bylo zaměněno za udržovací, které se skládalo z 0,5% laktalbuminhydrolyzátu v Earlově nárazníkovém roztoku a 2% telecího séra. pH kultur bylo zastaveno na hodnotu 7,6.

T i t r a c e v i r u byla prováděna na zkumavkových kulturách PK buněk za užití 5 zkumavek na jedno ředění viru.

T i t r y byly kalkulovány metodou podle Reed a Muench.

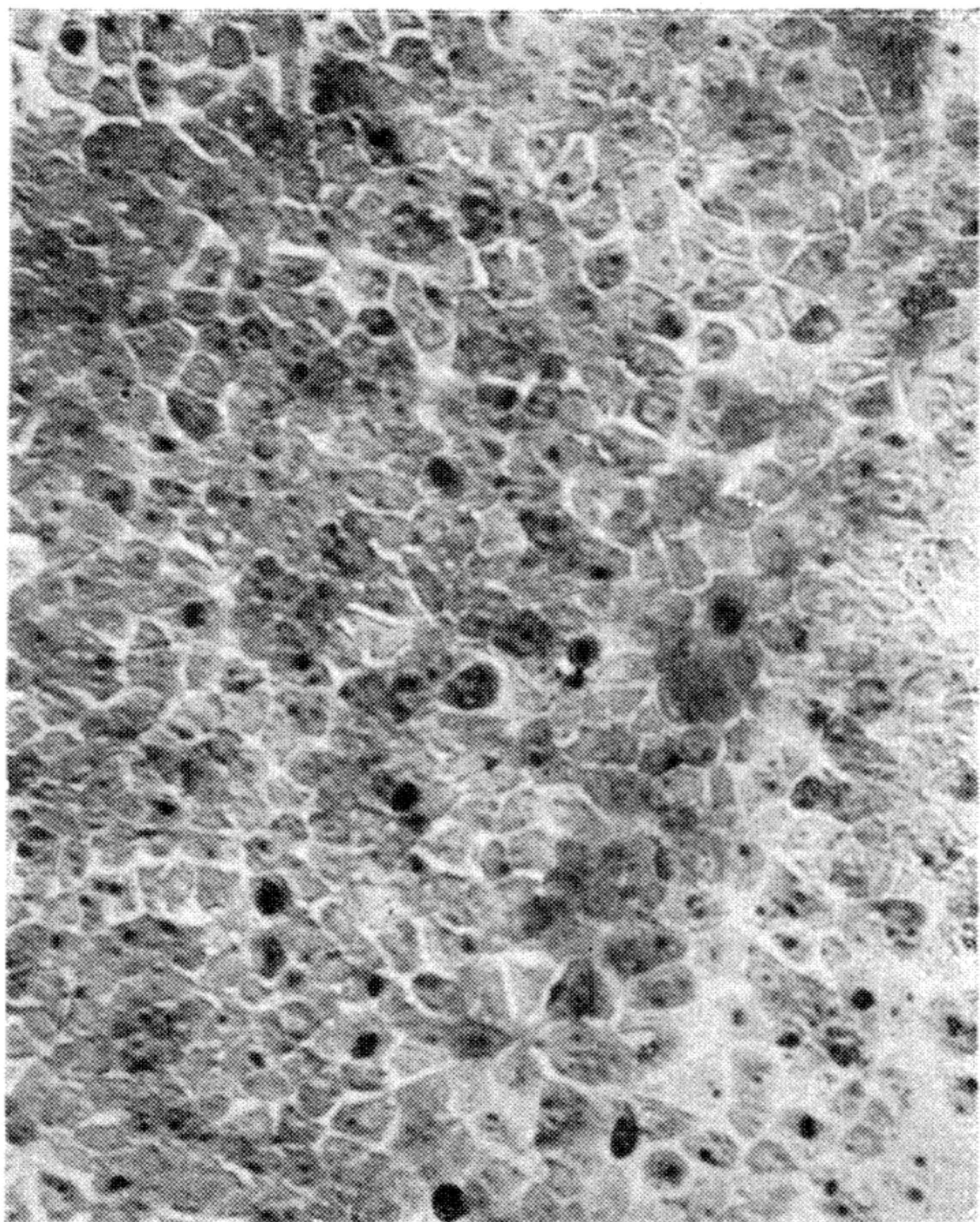
P r e p a r á t y barvené Giemsovým barvivem byly fixovány 2 hod. formalinem ředěným 1 : 10 fosfátphysiologickým nárazníkovým roztokem. Barvivo naředěné v poměru 1 : 20 bylo po propláchnutí kultur vodou ponecháno v kontaktu s tkání po dobu 1,5 hod. Po opláchnutí v alkoholu byly preparáty montovány a zhodovena fotografická dokumentace.

F á z o v ý k o n t r a s t : Kultury na sklíčkách s kapkou udržovacího media obsahujícího virus v množství 2×10^5 $TCID_{50}$ byly přeneseny na podložní sklo s konkávní jamkou a okraje byly zalepeny parafinem. Bylo užito fázového kontrastu fy Meopta.

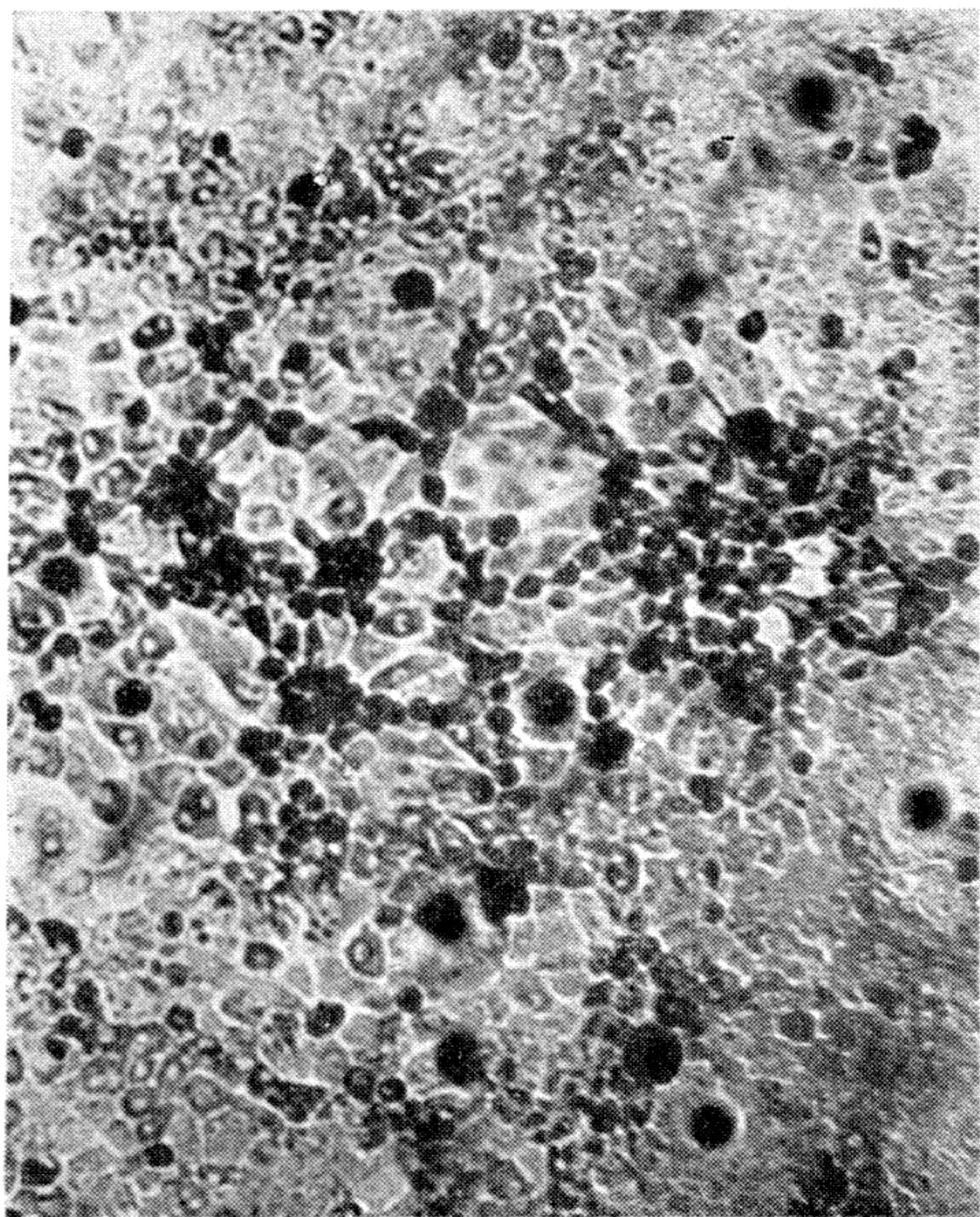
S n í m k y byly pořizovány za užití mikroskopu s vmontovanou kamerou fy Rathenow na film Isopan FF.

F l u o r e s c e n č n í m i k r o s k o p i e : V podstatě bylo použito metodiky popsané Coonsem a spol. (11), Poetschkelem a spol. (12) a Mussagayem (9). Gamma-globulin připravený frakcionací rinavolem (13) ze séra nemimunního a hyperimunního (neutralizační titr 1 : 512) byl značkován dansylchloridem stejně jako gamma-globulin získaný ze séra berana imunizovaného hyperimunním vepřovým gamma globulinem. 5% roztok bílkoviny ve fosfátphysiologickém nárazníkovém roztoku o pH 7,4 byl vytřepán práškem připraveným z acetonem delipidovaných vepřových ledvin k odstranění nespecifické fluorescence. Prášek byl od bílkoviny oddělen centrifugací s následnou filtrací supernatantu. Po trojnásobném opláchnutí kultur ve fosfátphysiologickém roztoku a dvacetivteřinové fixaci v absolutním alkoholu o teplotě -50°C byl preparát převrstven roztokem značkované bílkoviny, která byla ponechána na preparátu 1 hod. při pokojové teplotě. Po skončení „barvení“, po kteroužto dobu byly preparáty uzavřeny v misce, aby se zabránilo nadměrnému vysychání, trojnásobném opláchnutí fosfátphysiologickým roztokem a rychlém usušení, byl na preparát přidán glycerin ředěný 1 : 10 ve fosfátphysiologickém roztoku a překryt krycím sklíčkem, které bylo na okrajích uzavřeno parafinovým rámečkem. Preparáty byly prohlíženy a fotografovány fluorescenčním mikroskopem fy Zeiss za užití obloukové lampy jako světelného zdroje a filtru propouštějícího UV světlo.

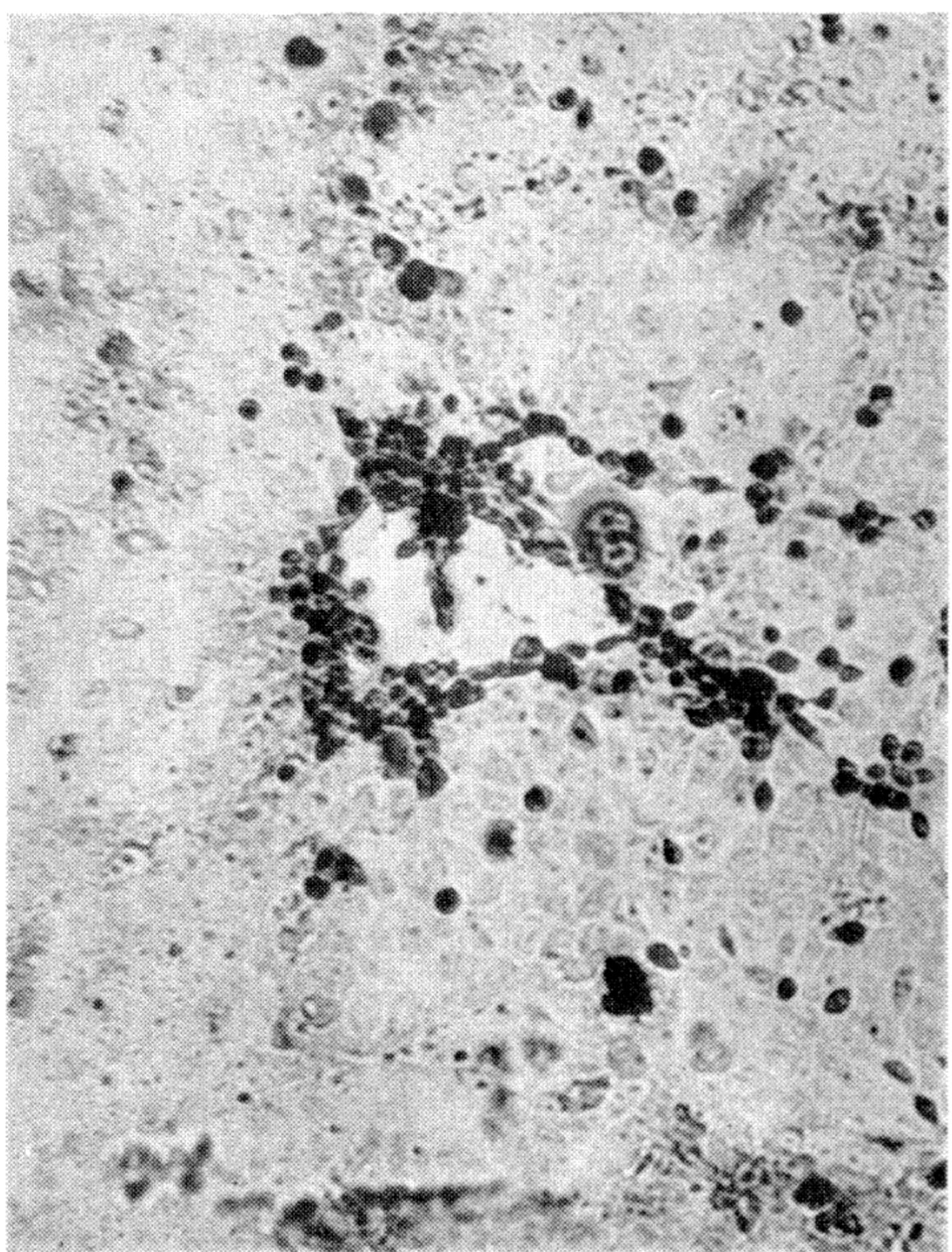
Mikroskopický rozvoj cytopatogenních změn vyvolaných virem I. O. na PK buňkách. (Giemsa, primární zvětšení $50\times$)



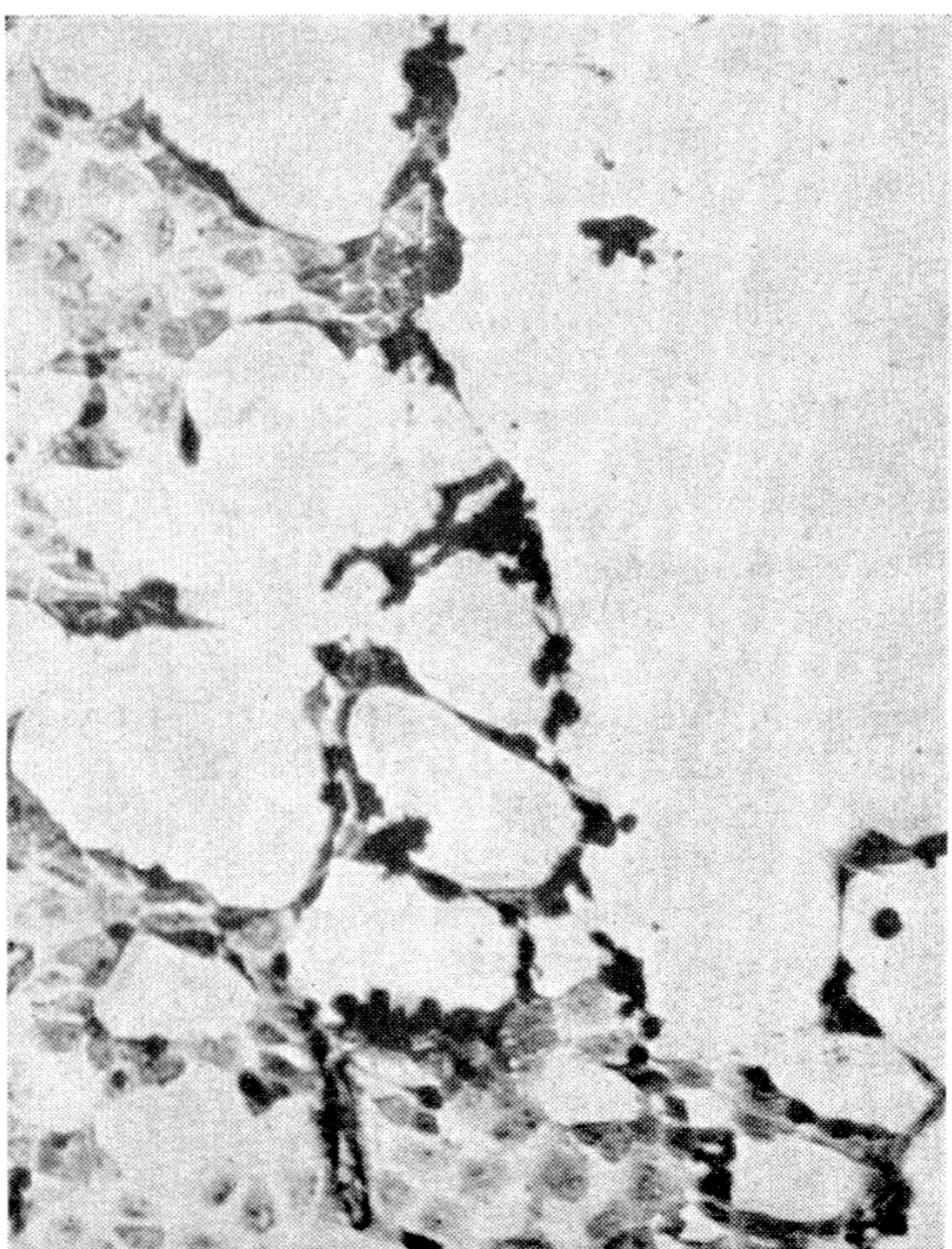
1. Normální kontrolní tkáň.



2. Protahování a shlukování buňek.

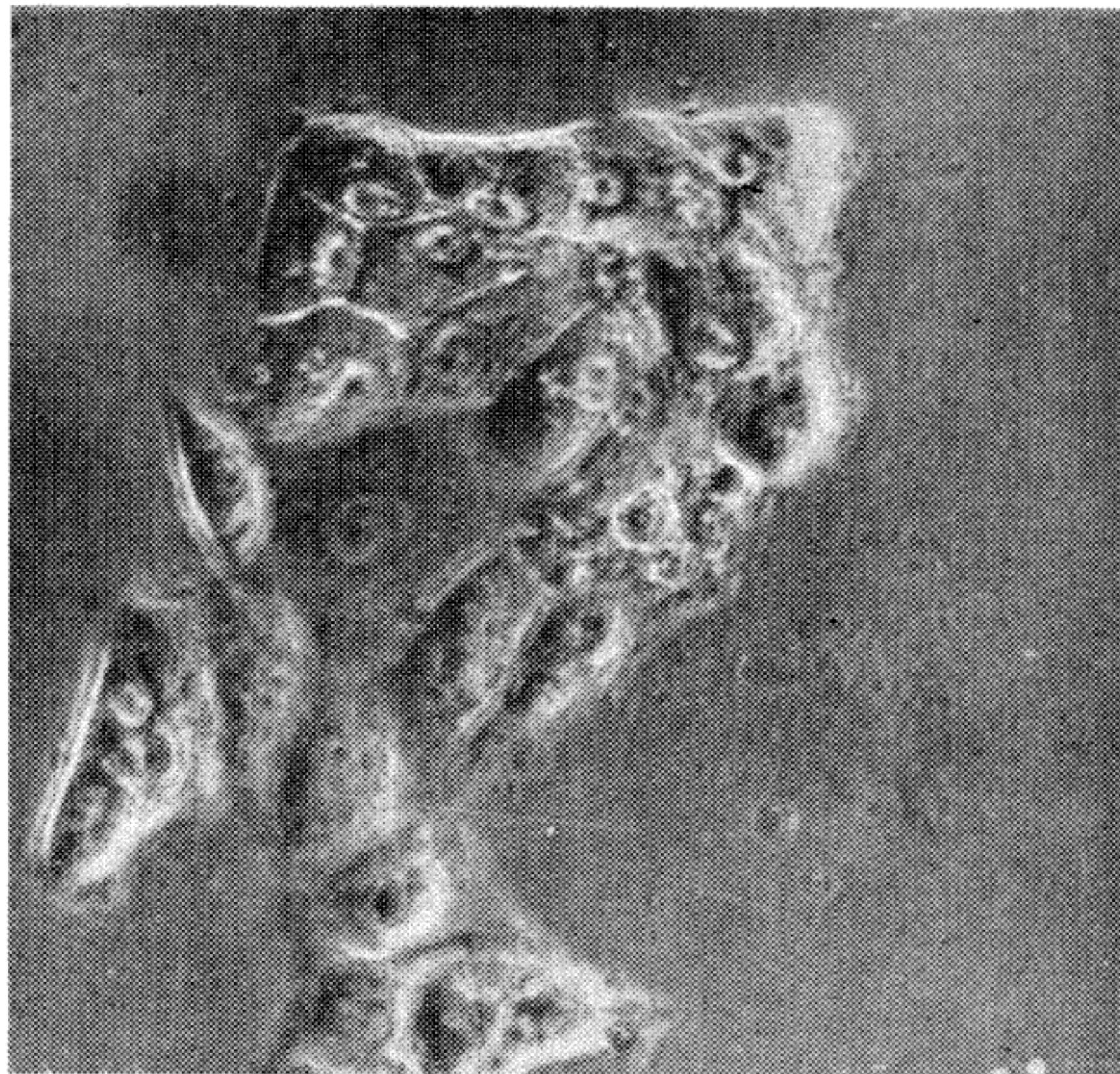


3. Retrakce buněk s volným prostorem uprostřed — „nativní plaque“.

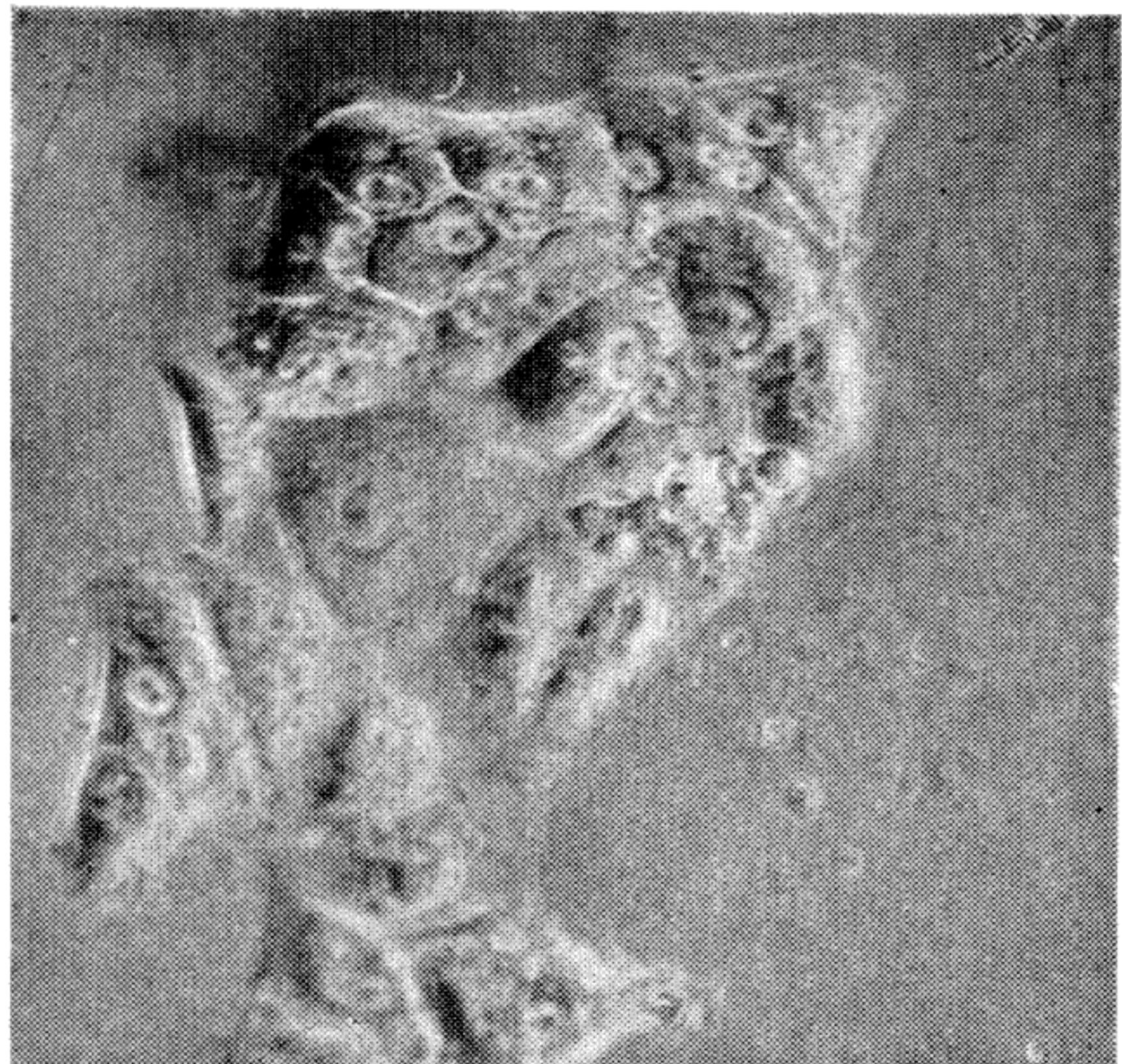


4. Síťovitá struktura, konečný rozpad.

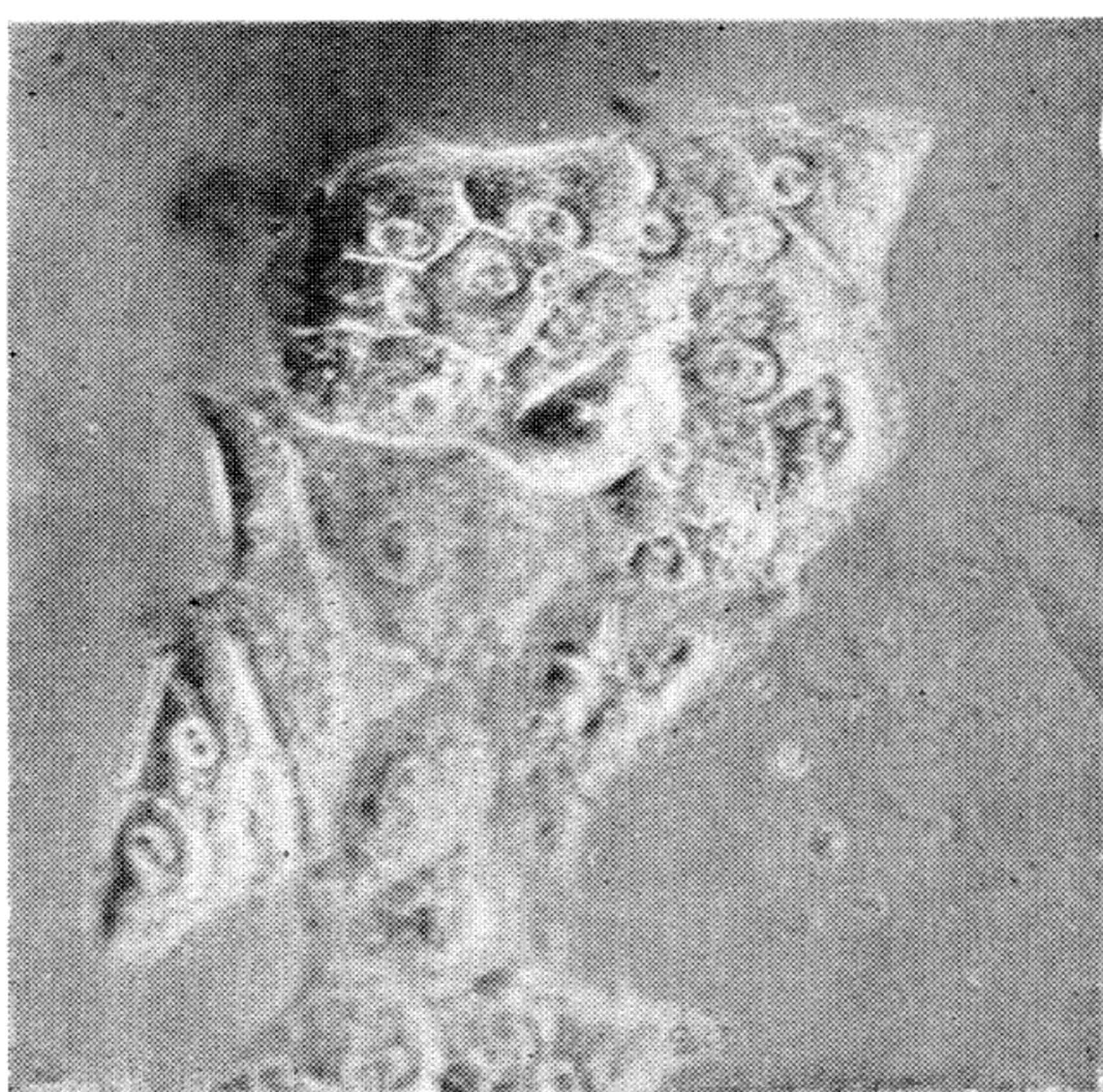
Morfologické změny, vyvolané virem I. O. na PK buňkách, sledované ve fázovém kontrastu při zvětšení $120\times$.



5. Bezprostředně po infekci.

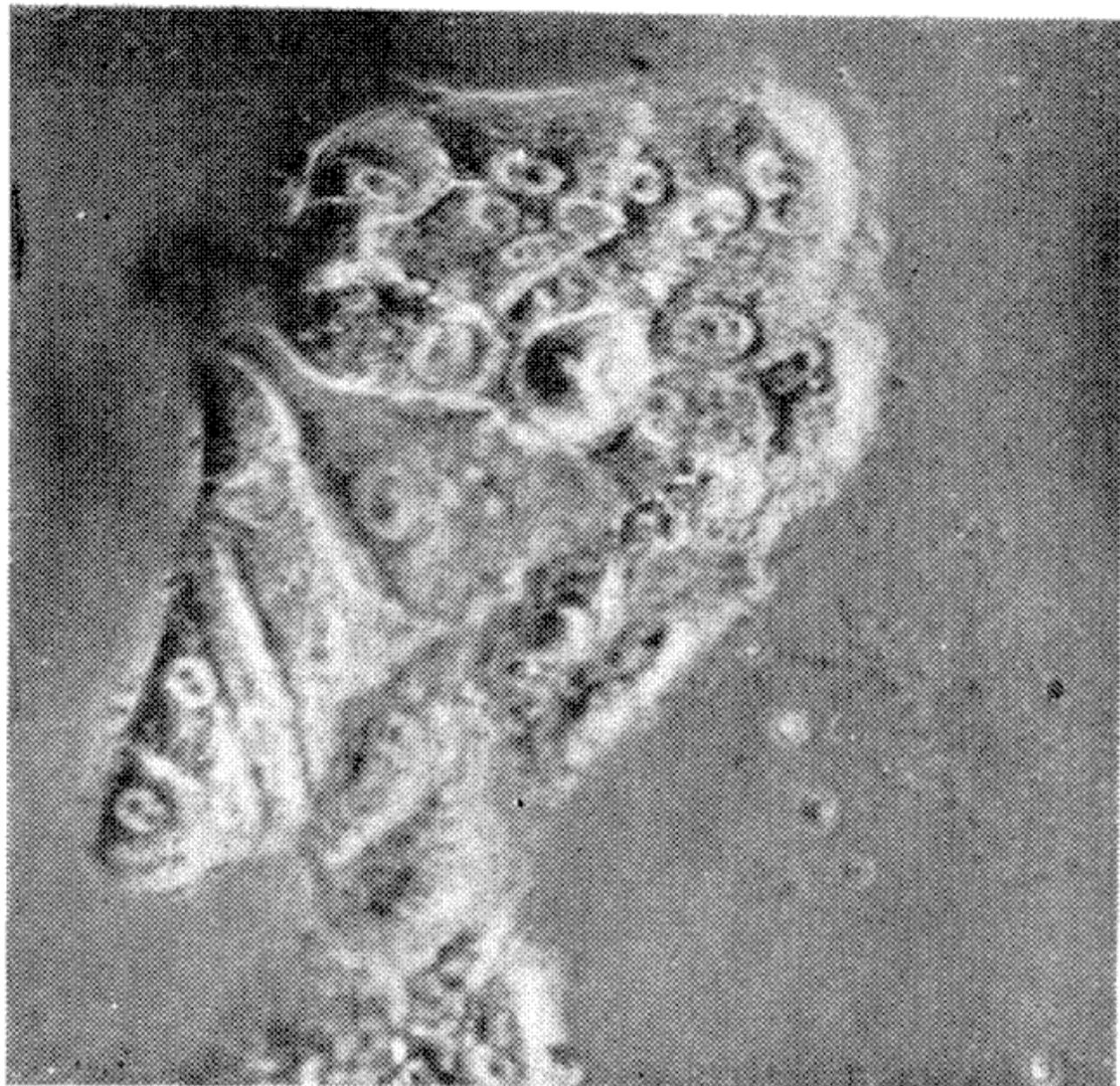


6. 7 hodin po infekci.

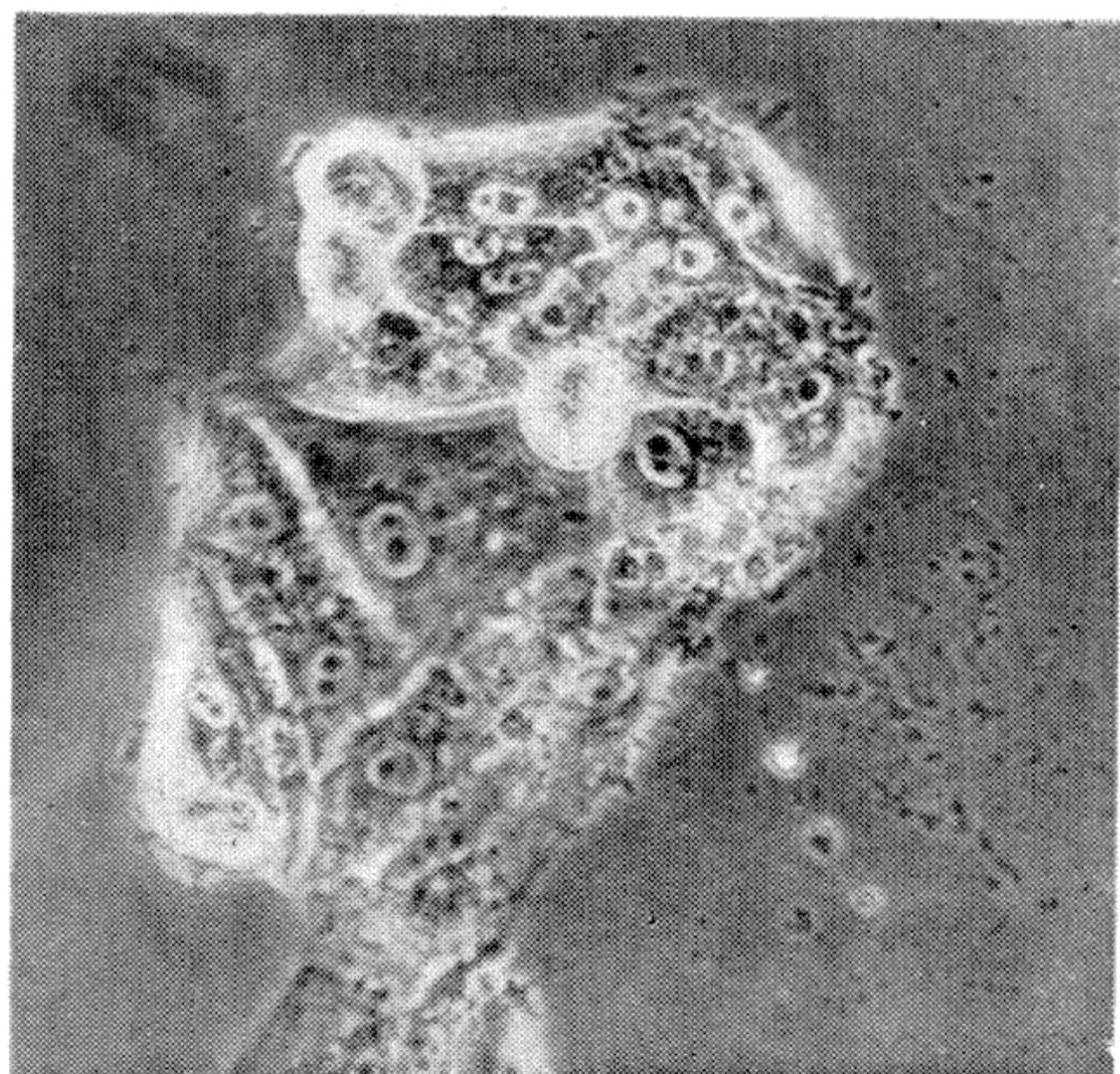


7. 13 hodin po infekci.

8. 16 hodin po infekci.

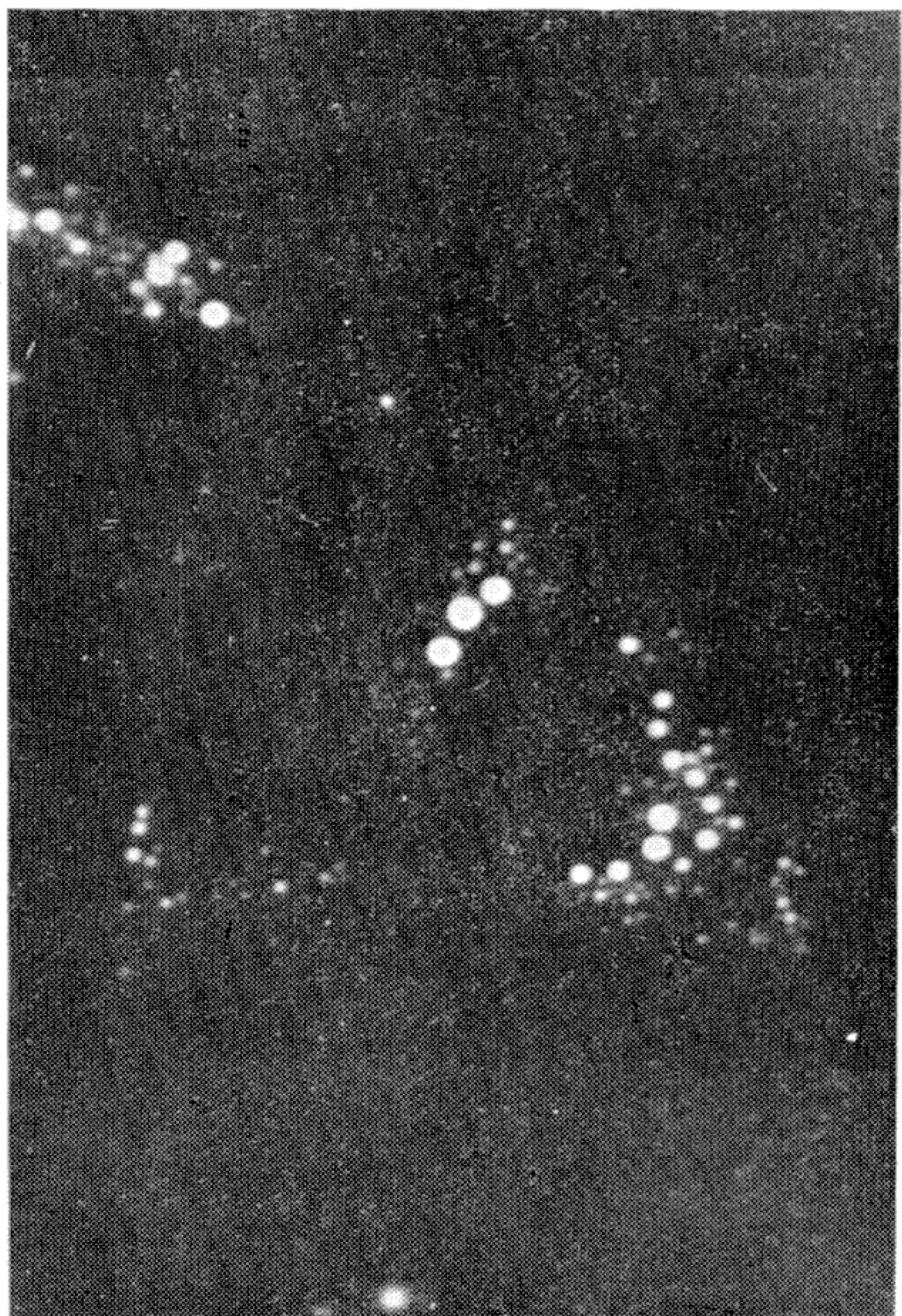


9. 18 hodin po infekci.

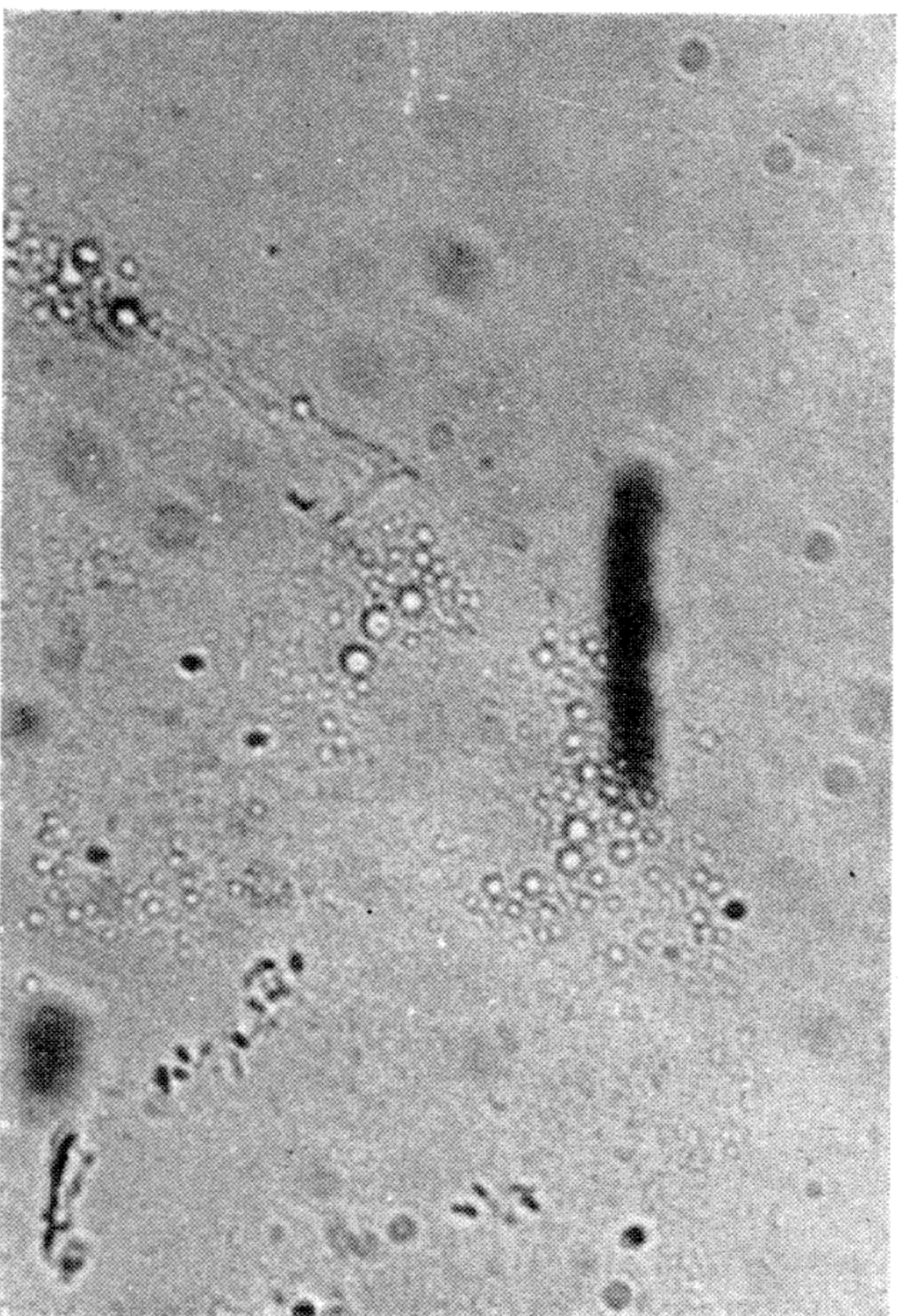


10. 19 hodin po infekci.

Detekce intracellulárně pomnoženého
virusu I. O. v PK buňkách.

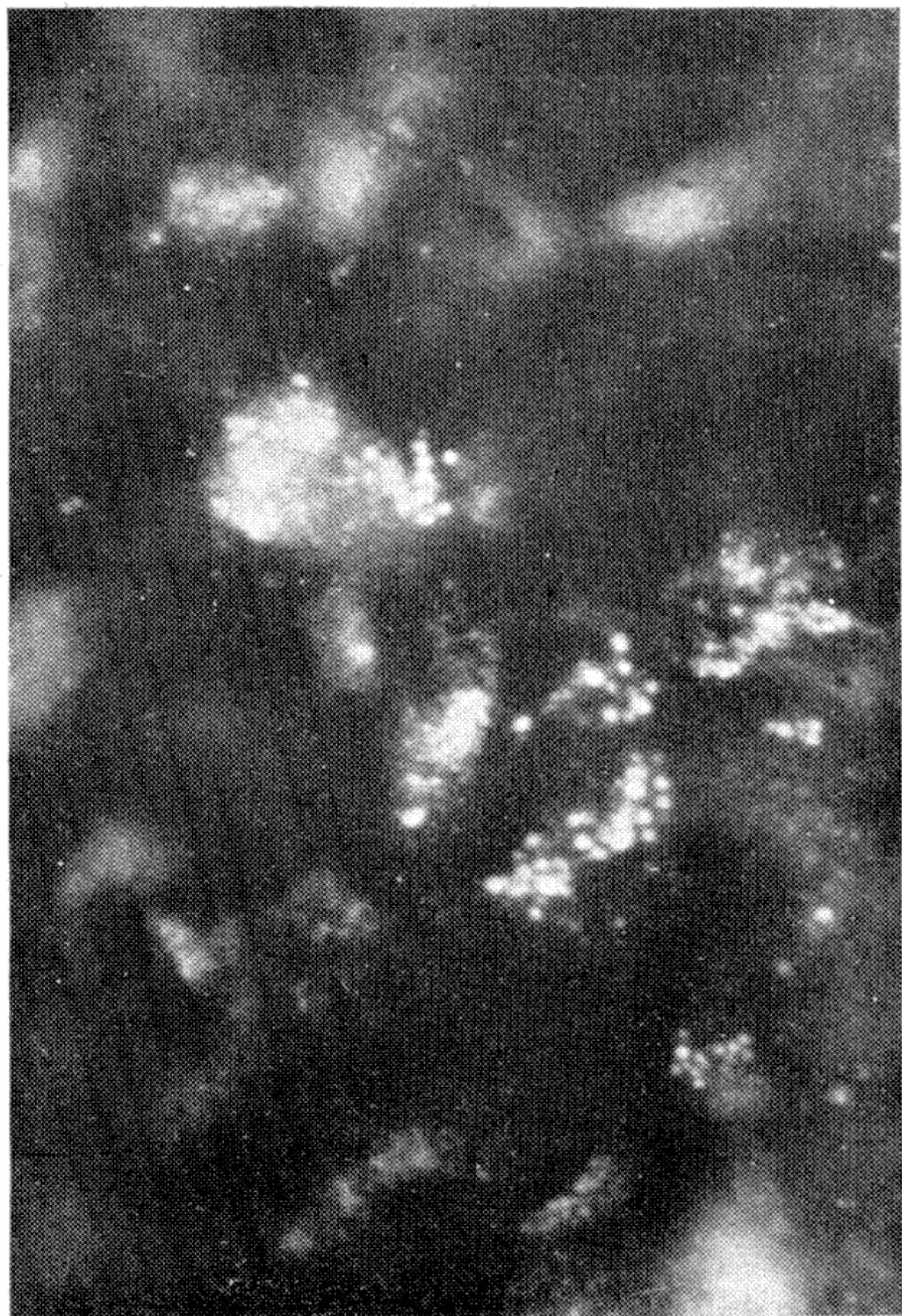


11. 4 hodiny od infekce.



12. 4 hod. od infekce — stejné pole
v zástinu.

13. 6 hodin od infekce.



14. Kontrolní kultura bez viru.



Výsledky

Stabilní buněčná linie má zřetelný epitheliální charakter a po dobu 1,5 roku si v našich laboratorních podmínkách po více než 40ti pasážích udržela konstantní vlastnosti (obr. 1).

Kultury PK buněk reagují na pomnožení viru I. O. vepřů cytopatogenním efektem (v dalším CPE), který je na kontiluentních kulturách při námi užívaném způsobu kultivace typický a svým charakterem poněkud vyjímečný.

Počáteční změny jsou charakterizovány okrouhlými buňkami větší denzity ve srovnání s okolím a jsou velmi zřetelné (obr. 2). V dalším průběhu a rozvoji CPE kolem ložiska původního infektu se formují tmavší protáhlé buňky; dochází postupně k retrakci směrem k okrajovým partiím ložiska poškozené tkáně a vzniká obraz, který upomíná plak (obr. 3). Konečný vzhled kultur má pak, a to hlavně tam, kde degenerativní změny probíhaly pomalu pro malé množství inokulovaného viru, sjtovitý charakter (obr. 4).

U kultur infikovaných většími virovými kvanty změny probíhají velmi rychle, tj. do 48 hod. jest kultura totálně desintegrována a formace popsaných síťovitých útvarů se neobjeví. CPE vyvolaný virem I. O. vepřů na PK buňkách je tedy zřetelně odlišný od změn vyvolaných na primokultuře vepřové ledvinné tkáně, jak byla popsána jinými autory i námi (3, 4). Odlišný charakter CPE je zvláště zřetelně patrný při infekci PK kultur virem ve vyšším ředění a pro svůj specifický ráz prakticky vylučuje omyly způsobené nespecifickými degenerativními změnami tkáně, které bývají často pozorovatelné u primokultur vepřové ledvinné tkáně, zvláště u kultur získaných z ledvin starších kusů.

Při studiu morfologických změn vyvolaných virem I. O. vepřů na PK buňkách, sledovaných fázovým kontrastem, byl vybrán ostrůvek buněk, který byl pak sledován pravidelně ve třiceti až šedesáti minutových intervalech. Změny vyvolané pomnoženým virem na buňkách ve sledovaném poli byly porovnány s fotografickým záznamem, pořízeným bezprostředně po infekci (obr. 5). Buňka ležící uprostřed pozorovaného pole vykazovala známky poškození nejdříve. První známky buněčné alterace pozorovatelné při užitém zvětšení 120 \times se v našem zorném poli objevily v intervalu 7 hod. po infekci, kdy buňka počítá měnit svůj objem ve smyslu pyknózy, jak patrno z jiné roviny ostrosti její povrchové části proti okolním buňkám (obr. 6). Po třináctihodinovém intervalu vidíme u této buňky lateralizaci jádra, mění se intrukleární struktura, perinukleární zóna má změněnou transparenti. Děj probíhá zatím v pozorovaném poli ojediněle (obr. 7). Po šestnáctihodinovém intervalu buněčná membrána ohraňuje již více zaokrouhlenou buňku, prázdný lem na okraji a centrální densita svědčí pro její prostorovou změnu do tvaru kcule. Jaderná struktura je jen zčásti zachována, uvnitř jádra jsou vidět jen stínovité, neohraničené zbytky nukleonů. Na dalších buňkách v témže zorném poli jsou vidět počáteční známky degenerativních změn (obr. 8). Po osmnáctihodinovém intervalu od infekce se buňka uvolňuje ze souvislosti s okolím, známky formování kulovitého útvaru jsou markantní. Jádro ztrácí své ohrazení proti cytoplasmě. Buňka je ostře limitována proti svému okolí (obr. 9). Po devatenáctihodinovém intervalu je zaokrouhlování buňky dokonáno, výsledkem je kulovitý útvar uvolněný ze souvislosti s okolní tkání (obr. 10).

Kontrolní tkáň bez přidání viru, inkubovaná paralelně, nejevila podobné známky ani po ukončení maximální pozorovací doby.

Při sledování intracelulárního pomnožování viru I. O. vepřů methodou fluorescenční mikroskopie byly infikovány sklíčkové kultury PK buněk množstvím

5×10^5 TCID₅₀ viru na jednu Petriho misku. První zřetelná fluorescence značkováné protilátky navázané na virus se objevuje po čtyřech hodinách od infekce. Vytváří granula různé velikosti, lokalizovaná v cytoplasmě v perinukleárním prostoru (obr. 11). Totéž místo pozorované v zástinu za užší viditelného spektra svěla ukazuje odpovídající si granulace v perinukleární arei (obr. 12). V dalším průběhu granulací přibývá, maxima je dosaženo v intervalu 6 až 7 hod. po infekci, kdy jsou přítomné granulace v cytoplasmě ve velkém rozsahu, leckdy na některých místech splývající. Jaderná oblast zůstává prostá fluoreskujících granulací (obr. 13). Po 8 hod. se granulace ztrácejí, ale buněčná plasma difúzně fluoreskuje, v dalších hodinách se stává fluorescence nezřetelnou. V jedné sérii pokusů, kdy byla pozorovací doba prodloužena, další zřetelná fluorescence se objevila v desetihodinovém intervalu, tedy 4 hod. po prvním dosaženém maximu záření. V pokusu, ve kterém jsme užili značkované protilátky proti vepřovému gamma globulinu, který se vázal na virus-gamma globulinový komplex, jsme dosáhli odpovídajících výsledků.

Kontrolní kultury, zpracované stejným způsobem kromě přidání viru, vykazovaly proti infikovaným, které zářily žluťozeleně, jen lehkou zelenavou difúzní fluorescenci, bez jakýchkoliv fluoreskujících granulací v cytoplasmě (obr. 14).

Diskuse

Z výsledků experimentů o detekci intracelulárního pomnožování viru I. O. vepřů na tkáňových kulturách PK buněk vyplývá:

1. že k zřetelnému intracelulárnímu pomnožení viru dochází v šesti hodinách po infekci, první hodnotitelné známky přítomnosti viru v buňce nastupují již po 4. hodině,

2. po přechodném úbytku odkrytelných fluoreskujících granulací druhé maximum fluorescience následuje v intervalu desetihodinovém, což podle našeho soudu znamená další etapu množení v nově zachvácených buněčných elementech.

Porovnáme-li svou práci s prací M u s s g a y o v o u (9), vidíme, že výsledky jsou zhruba analogické, i když použito zcela jiné metodiky fluorescenční na jedné straně a stabilní buněčné linie místo primokultury na straně druhé. Hlavním rozdílem je to, že u nás získané výsledky byly porovnány se stejným procesem hodnoceným v nativním preparátu ve fázovém kontrastu, kdežto u experimentů M u s s g a y o v ý c h (9) byl morfologický korelát porovnán s preparáty barvenými podle P a p p e n h e i m a. Náš pracovní postup má výhodu v možnosti plynulého sledování stále stejných buněčných systémů, takže zachycuje skutečnou dynamiku virového množení. Na rozdíl od citovaného autora se ztěží můžeme vyjádřit o přítomnosti viru uvnitř jádra odkrytelného fluorescenční metodikou. Z porovnání výsledků získaných fluorescenční mikroskopii a fázovým kontrastem lze uvést určitou souvislost s maximem fluorescence, která spadá do údobí šesti hodin po infekci a počátečními morfologickými změnami v námi plynule sledovaném zorném poli viditelnou v sedmihodinovém intervalu, tedy v době, kdy fluorescence ubývá. Předpokládáme z těchto změn, tj. z vymizení fluorescencí v intervalu od šesti do osmi hod., že pomnožení viru v infikované buňce proběhne do tohoto časového intervalu a ze extruse viru probíhá již na stupni iniciálního poškození buněk. Vylučování viru do prostředí je patrné i z pokusů sledujících vylučování viru z tkáňových

kultur do media v závislosti na čase uplynulém od infekce, kde pomnožený virus lze prvně extracelulárně prokázat v intervalu od pěti do deseti hod. po infekci (6).

Srovnáme-li svoje pozorování s tím, co se dosud uvádí, a to zejména v pracích Ackermannových, o množení viru v buňce (nověji propracováno i na virus poliomylitický), můžeme říci asi tolik: interakce viru a buňky se skládá z řady na sebe navazujících fází, z nichž proují stadium přilnutí viru k buňce, další jeho penetrace, potom mizení viru v buňce čili stadium eklipsy, po ní za současného velkého zvýšení metabolické aktivity buňky a zmnožení jejího celého nukleoproteinového materiálu, počíná se nově vytvořený virus organizovat, dozrává ve své morfologické i antigenní struktuře stejně jako v patogenitě a konečně za pozvolného svraštování buňky jest jí postupně eliminován do prostředí. Rozpad buňky nastává až později, a je výsledkem nejenom virového množení, nýbrž i nepoměru celkového abnormalního růstu všech buněčných nukleoproteinů.

Z celého tohoto cyklu zachytala v našich pokusech fluorescenční metodika nejpravděpodobněji pouze konec fáze virové organizace a jeho maturaci, přičemž vymizení granulární fluorescence označuje asi již extrusi viru. Fázový kontrast na případu jediné buňky nám doplňuje a rozšiřuje do dalších etap celé toto dění plynulou demonstrací toho, co se s buňkou, eventuálně jejími elementy, děje při témže patologickém procesu. Změny, jak byly demonstrovány fázovým kontrastem, začínají přibližně po fázi maturace, ukazují zhruba buněčnou alteraci i rozplývání jádra během fáze extruse, se zaokrouhlením až ke konečnému CPE.

V souvislosti s výsledky našich experimentů je snad zajímavé vzpomenout, že změny postihující jádro včetně jeho zmizení jsou podobné oněm, které Bodian pozoroval na nervových buňkách předních rohů míšních v průběhu experimentální paralýzy u opic (14).

Souhrn

1. Byly sledovány morfologické projevy kultur stabilní linie epithelu vepřových ledvinných buněk (kmen PK), infikovaných virem I. O. vepřů. PK buňky reagují na pomnožení viru I. O. vepřů zcela typickým cytopatogenním efektem, lišícím se od změn vyvolávaných tímto virem na primokulturách vepřové ledvinné tkáně.

2. Fázovým kontrastem byly sledovány časné morfologické změny PK buněk infikovaných virem I. O. vepřů a časově porovnávány s intracelulární produkcí viru detekovanou přímou i nepřímou metodou fluorescenčních protilátek. První fluoreskující granulace byly prokazatelné po čtyřech hod. od infekce kultur s maximem po šesti hodinách. Do osmé hodiny fluorescence mizí. Druhé maximum fluorescence bylo prokazatelné v intervalu deseti hodin.

První morfologické změny byly prokazatelné fázovým kontrastem po 7. hod. od infekce.

Úbytek fluoreskujících granulací spadá do stejného časového údobí jako počáteční tvorba CPE a doby vzestupu extracelulárně uloženého viru.

3. Jsou diskutovány jednotlivé fáze interakce viru I. O. vepřů s buňkami stabilní linie epithelu vepřové ledviny (kmen PK) a jejich časové ohrazení.

* * *

Literatura k nahlednutí u autorů.

Биологические свойства вируса инфекционного энцефаломиелита свиней, культивированного на тканевых культурах стабильной линии эпителия почечных клеток свиней (штамм PK)

1. Изучались морфологические проявления культур стабильной линии эпителия почечных клеток свиней (штамм PK), инфицированных вирусом инфекционного энцефаломиелита свиней. PK клетки реагируют на размножение вируса инфекционного энцефаломиелита свиней совершенно типической цитопатогенностью, отличающейся от изменений, вызванных этим вирусом на первичных культурах почечной ткани свиней.

2. При помощи фазового контраста изучались первоначальные морфологические изменения PK клеток, инфицированных вирусом инфекционного энцефаломиелита свиней и по времени сравниваемых с внутриклеточной продукцией вирусов с помощью детекции непосредственным и косвенным методом флюoresцирующих антител. Первые флюoresцирующие грануляции появляются через 4 часа со времени инфекции культуры с максимумом через 6 часов. Через 8 часов флюoresценция исчезает. Второй максимум флюoresценции появился в интервале 10 часов.

Первые морфологические изменения при помощи фазового контраста были доказаны через 7 часов после инфекции

Убыль флюoresцирующей грануляции относится к тому же периоду времени как и начальная фаза образования CPE и периода развития экстрацеллюлярно расположенного вируса.

3. Обсуждались отдельные фазы интеракции вируса инфекционного энцефаломиелита свиней с клетками стабильной линии эпителия почки свиней (штамм PK) и их ограничение в отношении времени.

Die biologischen Eigenschaften des auf Gewebskulturen einer stabilen Linie von Nierenepithelzellen von Schweinen (Stamm PK) gezüchteten Virus der ansteckenden Schweißlähme (AS)

1.Untersucht wurden die morphologischen Äußerungen einer stabilen Linienkultur von Nierenepithelzellen von Schweinen (Stamm PK), die mit dem Virus der AS infiziert worden waren. Die PK Zellen reagieren auf die Vermehrung des Virus der AS in Form eines ganz typischen zytopathogenen Effekts, der sich von den Veränderungen, die das Virus auf Primokulturen von Nierengewebe von Schweinen hervorruft, unterscheiden.

2. Mittels Phasenkontrast wurden die frühzeitigen morphologischen Veränderungen der mit dem Virus der AS infizierten PK Zellen untersucht und zeitlich mit der intrazellulären Produktion des Virus verglichen, die mittels direkter und indirekter Methode der fluoreszierenden Antistoffe ermittelt wurde. Die ersten fluoreszierenden Granulationen waren 4 Stunden nach Infektion der Kultur bei einem Maximum nach 6 Stunden nachweisbar. Die Fluoreszenz schwindet innerhalb von 8 Stunden. Ein zweites Maximum der Fluoreszenz war im Intervall von 10 Stunden nachweisbar.

Die ersten morphologischen Veränderungen waren mittels Phasenkontrast 7 Stunden nach Infektion nachweisbar.

Das Schwinden fluoreszierender Granulationen fällt in die Zeitspanne des Beginns der CPE Bildung und in die Zeit der Vermehrung des extrazellulär gelagerten Virus.

3. Besprochen werden die einzelnen Phasen der Interaktion des Virus der AS mit den Zellen der stabilen Linie des Schweinenierenepithels (Stamm PK) und ihre zeitliche Beschränkung.