

Ústav lékařské mikrobiologie KU, Praha, přednosta prof. Dr F. Patočka

KULTIVACE VIRUSU ENCEPHALOMYELITIS ENZOOTICA SUUM V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH HOMOLOGNÍ TKÁNĚ II.

B. KORYCH, FR. PATOČKA, VL. KUBELKA

V předchozích pracích bylo prokázáno, že virus Těšínské choroby vepřů se pomnožuje v tkáňových kulturách homologní tkáně (1, 2, 3). V literatuře nám dostupné jsme nenašli žádnou zmínku o cytopathogenním účinku virusu této nemoci, ačkoliv Horstmannová (4) a Larski (1) popisují pravděpodobné pomnožení virusu v tkáňových kulturách — v prvním případě embryonálních kuřecích, v druhém případě homologních ledvinných, v obou případech kultivovaných způsobem podle Maitlanda. V naší práci, v níž k průkazu virusu v homologních tkáních jsme většinou užívali tkáně vykazující fibroblastový růst a standardně jsme vybírali 4. den medium, výrazný cytopathogenní účinek virusu na tkáň nebyl patrný. Jen u tkání ledvinných byly vyznačeny změny, ukazující poškození buněk, ale k tak výrazným změnám, jako u poliomyelitidy lidské nedocházelo. Vzhledem k tomu, že tyto ledviny, jichž bylo užito v předchozí práci k pomnožování virusu, byly brány z dospělých zvířat a měly tendenci k spontánní degeneraci při delší době kultivace, nepokládali jsme tyto změny za dostatečně průkazné pro cytopathogenní účinek virusu vepřové obrny. Proto pro tento průkaz jsme zvolili homologní embryonální tkáň ledvinnou, kultivovanou ve formě monolayerů.

M a t e r i á l — m e t o d y: Vzhledem k tomu, že metodika zpracování vepřové tkáně není běžně rozšířena, popisujeme ji do všech podrobností.

Virus: Užito stejného virusového kmene jako v práci předchozí (3). Před inokulací na tkáňové kultury v tomto experimentu byl pasážován na vepřových tkáních s fibroblastovým charakterem růstu (kůže, plíce) ve třech pasážích a pak intracerebrálně inokulován v mediu z tkáňových kultur seleti. Míchy selete usmrceného za příznaků paralys po 7 dnech inkubace, bakteriologicky sterilní a s diagnosou obrny vepřů potvrzenou histologicky, bylo užito jako zdroje virusu.

Tkáňové kultury byly připravovány z kortexu ledvin vepřových embryí metodikou podle Bodiana (5) s malou modifikací. Embrya vyňata z gravidní dělohy ne déle než 3 hodiny po porážce zvířete. Výhodnější pro nás byla embrya z druhé poloviny gravidity, kdy byly ledviny již větší a vhodnější ke zpracování. Po vynětí ledvin a jejich dekapsulaci byl odstřižen kortex, který byl nastříhán na malé kousky o průměru ne větším než 2 mm. Nastříhaná tkáň mnohonásobně promytá Hanksovým roztokem za přidání antibiotik penicilinu a streptomycinu po 50 j. ev. μg na 1 ml, až byla supernatantní tekutina úplně čirá. Na tkáň po odsátí poslední promývací tekutiny nalito 150 ml 0,25% trypsinu (Organofarma č. š. 1202/4,5) v Hanksově roztoku za přidání stejného množství antibiotik jako při promývání. pH trypsinu upraveno 1,4% Na bikarbonátem na 7,5. Tkáň s trypsinem nalita pak do 500 ml širokohrdlé Erlenmeyerovy láhve s 6 zářezy na bocích a otvorem pro pipetování na straně. Do láhve horem zavedena skleněná tyčinka tvaru T nasazená na ose vertikální míchačky, která se otáčela rychlostí asi 350 otáček za min. Trypsinováno 2 hodiny při pokojové teplotě (22° C), supernatant odssát a na sedimentované fragmenty nalito znovu 150 ml trypsinu s antibiotiky, pH 7,5. Trypsinováno za stejných obrátek a za stejné teploty další dvě hodiny. Po této době byl supernatant postranním otvorem odpipetován do centrifugačních nádobek o objemu 65 ml v množství 50 ml do jedné nádoby, centrifugován a sedimentované buňky promyty. Na zbývající fragmenty byl přidán opět trypsin ve stejné koncentraci a množství a trypsinování pokračovalo po další dvě hodiny. Zpravidla po tomto třetím trypsinování tkáně byly kompletně rozvolněny do buněk.

Při promývání bylo první centrifugování prováděno na horizontální centrifuze při 800 rpm po 5 minut, supernatant zpravidla dosti kalný, dekantován. Na sedimentovanou tkáň nalit stejný objem Hanksova nárazníkového roztoku, buňky promíchány pipetou a centrifugovány po dobu

5 minut při stejném počtu obrátek jako při první centrifugaci. Supernatantní tekutina dekantována, na sediment nalit stejný objem Hanksova roztoku, buňky promíchány a centrifugovány při 800 rpm. Třetí proprání bylo provedeno v polovičním objemu Hanksova roztoku a centrifugováno 1 min. při 800 rpm. Tímto postupným centrifugováním docíleno poměrně velmi čisté buněčné suspence bez příměsí krvinek a buněčné drtě. Po dekantaci posledního supernatantu buňky resuspendovány v mediu a určeno jejich množství na 1 ml. Počítání buněk prováděno v Bürkerově komůrce po nabarvení trypanovou modří 0,5% v poměru 1 díl buněčné suspence na 2 díly barviva. Konečná suspence buněk v mediu upravena pak na hodnotu 200 000 živých buněk na 1 ml.

Medium, jehož jsme užili ke kultivaci buněk, bylo jednak čisté laktalbuminhydrolysatové (0,5% laktalbuminhydrolysat práškováný v Hanksově roztoku, 2,5% koňského sera, antibiotika penicilin a streptomycin po 50 j. ev. μg , pH upraveno 1,4% natriumbikarbonátem na hodnotu 7,5) nebo medium laktalbuminhydrolysatové smíchané stejným dílem s hovězí amniovou tekutinou a 5% koňského sera. Toto druhé medium mělo výhodu v lepších nárazníkových vlastnostech. Výměna media prováděna zpravidla 4. den. Šestý den po nasazení byly buňky rozrostlé tak, že vytvářely souvislý jednovrstevný epitheliální povlak. V tuto dobu, po propláchnutí tkání alkalickým Hanksovým roztokem pH 7,6, prováděna infekce 10^{-1} suspensí míšňi v Hanksově roztoku v množství 0,1 ml na zkumavku. (Suspence před tím centrifugována 15 min. při 3.000 rpm, k infekci použito supernatanta.) Po 10min. inkubaci v horizontální poloze při pokojové teplotě přidáno medium do celkového objemu 1 ml. Inkubováno stationárně při teplotě 36,5^o C. Kontrola tkání prováděna denně, užité zvětšení 50X a 100X. Při ukončení experimentu prováděna zkouška bakteriologické sterility na krevním agaru a bujonu.

Jako kontroly postaveny kultury, ke kterým bylo stejným způsobem přidáno 0,1 ml supernatantu 10^{-1} suspence normálních myších mozků a kultury se samotným mediem.

V ý s l e d k y

72 hodin po infekci byly patrný první změny, odlišné od intaktních kontrolních tkání. Ohraničené skupiny buněk, obklopené normálními zdravými buňkami, nabývaly na svém objemu, jejich povrch se stával vyhlazený a buňky jakoby prominovaly nad okolní epitheliální tkáň. Po 96 hodinách bylo viděti ostrůvky buněk, které byly ve svém průměru větší než buňky epitheliální, zaokrouhlené s tmavším středem odděleným od buněčné blány úzkou světlou zónou. Mimo tyto velké buňky bylo vidět buňky malé, zaokrouhlené, s granulacemi. Oba tyto typy buněk ztrácely soudržnost s okolní neporušenou tkání. Rozsah změn se rozšiřoval do plochy. Po 120 hodinách granulace buněk význačná na četných místech, buňky ztrácejí soudržnost, v mediu drf.

Kontrolní zkumavky v tutéž dobu bez degenerativních změn. Medium bakteriologicky sterilní.

Změny vyvolané cytopathogenním agens na monolayeru epitheliální tkáně derivované z kortexu embryonálních vepřových ledvin, postupují v tomto sledu: buňka nejprve nabývá na objemu, její zevní struktura se postupně vyhlazuje a zaokrouhluje. Centrum buňky tmavne, je odděleno od buněčné blány úzkou zónou normální transparency, buněčná blána je jakoby ztlustělá. Následuje granulace buňky a její zmenšování, takže se jeví jako malý okrouhlý a tmavý útvar s granulární strukturou. Posledním stadiem je pak kompletní desintegrace buňky s rozpadem.

Pokusy tohoto druhu založeny celkem třikrát v různých časových intervalech v rozmezí 4 měsíců, a to po každé s přibližně stejným výsledkem.

Diskuse a závěry: V předcházejícím popsán sled změn na jednovrstevném epitheliálním buněčném povlaku vepřové embryonální ledvinné tkáně infikovaném materiálem obsahujícím vysoká kvanta virusu vepřové obrny. (Titr přibližně $10^{-3,1}$ při intracerebrální titraci na zvířeti.) Podle výsledků experimentem ověřených na zvířeti, popsaných v předchozí práci (3), máme jistě podstatné oprávnění soudit (i když experiment sám v tomto případě z technických důvodů nebyl možný), že jde o důsledek množení virusu těšínské choroby na těchto buňkách. Netroufáme si,

i když jsme fenomen v prakticky stejné míře opětovaně pozorovali, činiti striktní paralelu mezi ním a cytopathogenním efektem známým u převážné většiny lidských poliovirusů na vnímavých tkáních. Nemůžeme se však ubránit dojmu, že jde o fenomen podobný, i když kvalitativně a kvantitativně méně výrazný při přibližně stejných titrech užitého inokula. Jelikož není vyloučeno, že by se změny námi pozorované mohly stát zřetelnějšími adaptací tohoto virusu na tkáňových kulturách, učinili jsme přípravy k dalším plynulým pasážím na kulturách popsaného typu, zaměřeným také k titračnímu ohodnocení tohoto zjevu; tyto pasáže pak samozřejmě musí být doplněny experimentem na zvířeti.

Kvůli úplnosti stojí za zmínku i to, že jsme se pokusili popsaný fenomen inhibovat serem rekonvalescentního zvířete. Stejně jako předcházející, i tato část práce si vyžádá dalších a opětovaných pozorování s příslušným systémem kontrol.

S O U H R N

V práci popsána metodika kultivace jednovrstevného povlaku epitheliální tkáně derivované z kortexu embryonálních vepřových ledvin. Použito v podstatě metody popsané Bodianem s malou modifikací. Dobře rozrostlé epitheliální tkáně tvořící jednovrstevný povlak byly infikovány supernatantem 10^{-1} suspence mích obsahující virus encephalomyelitis enzootica suum. Po 3 dnech inkubace pozorovány na epitheliálních buňkách degenerativní změny celkem pomalu postupující, jejichž charakter je v práci blíže rozveden a které vedly k postupnému rozrušení buněk dobře odlišitelnému od kontrolních tkání. O povaze tohoto fenomenu a dalším pracovním postupu se v práci diskutuje.

В ы в о д ы

Культивация вируса инфекционного энцефаломиелита свиней (болезни Тешена) в тканевых культурах гомологических тканей II.

Описана методика культивации эпителиальных тканей полученных из коры почек свиных эмбрионов. Авторы в основном пользовались методом Бодiana с некоторыми модификациями. Эпителиальные ткани разросшие в одном слое были инфицированы 10^{-1} суспензией спинного мозга, содержавшего вирус инфекционного энцефаломиелита свиней (болезнь Тешена). После трехдневной инкубации в эпителиальных клетках были отмечены медленно распространяющиеся дегенеративные изменения. Эти изменения вели к постепенному разрушению клеток хорошо отличному от контрольных тканей. Широко описан характер изменений. Обсуждены процесс работы и характер этого цитологического явления.

S U M M A R Y

Cultivation of the Encephalomyelitisi enzootica suum Virus in Tissue Culture of Homologous Tissue II.

A technic of cultivation of epithelial tissues derived from the cortex of embryonic porcine kidneys is described in this report. Fundamentally with slight modifications the method devised by Bodian was employed. Epithelial tissues growing in one layer were infected with a 10^{-1} suspension of spinal cord containing the encephalomyelitis enzootica suum virus. After three days of incubation slowly progressing degenerative changes were observed in the epithelial cells. These changes lead to gradual desintegration of the cells unequivocally distinguishable from control tissues. An extensive description of the nature of the changes is given in this article. The further procedures and the nature of this phenomenon are discussed.

L I T E R A T U R A

1. Larski, Z.: Med. Vet. (Polsko) 11, 589, 1955. — 2. Mayr, A., Schwöbel, W.: Mh. Tierheilkunde 8, 49, 1956. — 3. Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.: Epidem., mikrobiol., imunol., 3, 2, 1957. — 4. Horstmann, D. M.: J. Immunol. 69, 379, 1952. — 5. Bodian, D.: Virology 2, 579, 1956.