

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE WIRUSA POMORU
RZEKOMEGO KUR (SZCZEP ROAKIN) PASAŻOWANEGO
W HODOWLI JEDNOWARSTWOWEJ KOMÓREK NERKI
ŚWINI *

ZDZISŁAW LARSKI

II Pracownia Wirusologiczna Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: doc. dr Z. Larski

Badaniom wirusa pomoru rzekomego drobiu (NDV) poświęcono bardzo dużo prac. Stanowi on przedmiot zainteresowania wirusologów weterynaryjnych jako czynnik etiologiczny choroby ważnej pod względem gospodarczym, a ponadto jest dogodnym wirusem modelowym w badaniach wirusologicznych.

Szerokie zastosowanie metod hodowli tkanek stworzyło dalsze możliwości poznania jego cech biologicznych. Szczególnie ważne są próby namnażania go w hodowlach tkankowych w celu produkcji szczepionki. Hodowla tkankowa umożliwia ścisłą kontrolę warunków namnażania wirusa i możliwość ich zmiany przez dobór różnych tkanek, różnych gatunków zwierząt, zarówno wrażliwych, jak i niewrażliwych na NDV w warunkach naturalnych, dalej temperatury namnażania, składu płynów odżywczych itd. Przy stosowanej do niedawna wyłącznie metodzie namnażania wirusa pomoru rzekomego kur w rozwijającym się zarodku kurzym, możliwości te były znacznie ograniczone koniecznością zapewnienia właściwych warunków dla rozwoju zarodka.

Stwierdzenie możliwości namnażania wirusa pomoru rzekomego w hodowlach tkanek zwierząt niewrażliwych na tę chorobę ma duże znaczenie. Stosowane dotychczas żywe szczepionki stwarzają niebezpieczeństwo przeniesienia zarazków innych chorób drobiu, np. zjadliwego wirusa pomoru rzekomego, *S. pullorum*, PPLO, wirusów ornitozy, a szczególnie wirusów limfomatozy. Szczepionki sporządza się bowiem przez namnażanie wirusa w zarodkach kurzych, które mogą pochodzić od kur-nosicielek, a brak

* Autoreferat — praca *in extenso* opublikowana została w *Medycynie Doświadczalnej i Mikrobiologii* 14(1) 51—68, 1962.

dotychczas prostych i nadających się do masowego stosowania metod umożliwiających wykrycie stanu nosicielstwa. *Cottrali* i współpracownicy (1954) wykazali w szeregu doświadczeń, że w środowisku zakażonym pozornie zdrowe kury znoszą jaja zawierające czynnik wywołujący limfomatozę wisceralną i osteopetrozę; w zarodkach jaj pochodzących od kur ze stada zakażonego neurolimfomatozą nie stwierdzono czynnika wywołującego tę postać choroby. *Burmester* i współpracownicy (1955) potwierdzili w doświadczeniach terenowych na dużym materiale zwierzęcym możliwość rozprzestrzeniania limfomatozy przez szczepienia szczepionkami żywymi, sporządzonymi z zarodków kur z ferm objętych tą chorobą.

Użycie hodowli tkanek ssaków do namnażania wirusa w celu produkcji szczepionki usuwa to niebezpieczeństwo.

B a d a n i a w ł a s n e

Mezogeniczny szczep Roakin wirusa pomoru rzekomego drobiu wykazywał przy namnażaniu go w hodowlach tkankowych komórek nerki świni stosunkowo słabe działanie cytopatogenne. Pojawiały się jedynie wstępne zmiany zwyrodnieniowe. W wielu przypadkach nawet w hodowlach zakażonych większymi stężeniami wirusa, obserwowano cofanie się zmian cytopatogennych i niekiedy regenerację tkanki. *Shimizui* i współpracownicy (1957) wykazali znaczne działanie cytopatogenne 3 innych szczepów tego wirusa, jednak w odmiennych warunkach hodowli tkankowej (przy użyciu płynu odżywczego utrzymującego o innym składzie). Podobne słabe działanie cytopatogenne i zdolność do regeneracji tkanki wykazał *Hallaue*r (1958), nawet dla zjadliwego szczepu wirusa pomoru rzekomego, przy namnażaniu go w przeszczepach tkanek ludzkich. Wyraźne różnice działania cytopatogennego szczepów zjadliwych i niezjadliwych można stwierdzić w hodowlach tkanek zarodka kurzego, jak to wykazali *Bangi* i *Warwick* (1957) w hodowlach rotacyjnych, a *Mussgay* i *Russe*w (1960) w hodowlach jednowarstwowych.

Przy tak słabym działaniu cytopatogennym badanie zmian morfologicznych wymagało użycia odpowiedniego płynu odżywczego utrzymującego. Wybrano do tego celu płyn owodniowy krowy. Jest to najdogodniejszy płyn naturalny, gdyż podobnie jak ultrafiltrat surowicy i płyny syntetyczne, zapobiega tworzeniu się kuleczek tłuszczu w protoplazmie hodowanych komórek i umożliwia utrzymywanie hodowli w dobrym stanie przez długi okres bez konieczności jego wymiany. *Klön*e (1958) podkreśla również, że nie hamuje on wzrostu szeregu wirusów. Z uwagi na brak danych z piśmiennictwa dotyczących wpływu tego płynu na namnażanie wirusa pomoru rzekomego nastawiono doświadczenie, które nie wykazało

działania hamującego. Płyn HSH był płynem znacznie gorszym i hodowle ulegały dość szybko zmianom, co uniemożliwiało prowadzenie dłuższych obserwacji.

W trakcie 36 pasażów nie wykazano zmian cytopatogenności szczepu dla hodowli komórek nerki świni. Założenie pracy nie wymagało prowadzenia większej ilości pasażów, jak to ma miejsce w badaniach, których celem jest uzyskanie szczepu niechorobotwórczego. W opisanych doświadczeniach szczep wyjściowy był szczepem niezdolnym.

Badanie ilości wirusa w poszczególnych pasażach wykonywano przez określanie TID_{50} w hodowlach tkankowych oraz LD_{50} na zarodkach kurzych. Z reguły przy pierwszym pasażu na zarodkach materiału z hodowli uzyskiwano miano niższe, jednak już w drugim pasażu osiągało ono wartość równą wirusowi wyjściowemu. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi *Chanaocka* (1955), dotyczącymi namnażania wirusa pomoru rzekomego w hodowlach nerek małpy.

Dynamikę namnażania się wirusa w hodowli tkankowej określono drogą zakażenia zarodków. Oznaczenie takie wykonano dla 5, 10 i 31 pasażu wirusa w hodowli tkankowej. Wykres wskazuje różnice krzywej wzrostu i utrzymywania się wirusa. W wyższych pasażach obserwuje się przedłużenie okresu utrzymywania się wirusa w hodowli i w 31 pasażu stwierdza się go jeszcze po 42 dniach. Świadczyć ono może w pewnym stopniu o postępującej adaptacji wirusa do tkanki nerki świni, co wyraża się pojawieniem się pewnego stanu równowagi między komórką a wirusem. Obniżanie się poziomu miana wirusa po tak długich okresach namnażania w hodowli jest w znacznym stopniu następstwem zmian starczych tkanki. Niemniej jednak różnice między badanymi pasażami są wyraźne, zwłaszcza że uzyskano je w tych samych hodowlach tkankowych.

Dawka wirusa użyta do zakażenia hodowli nie miała wpływu na jego końcowe miano w materiale pobieranym w 24 godziny po wystąpieniu pierwszych zmian cytopatogennych. Porównanie miana wirusa w pełnej hodowli tkankowej i w samym płynie odżywczym świadczy o szybkim i pełnym uwalnianiu się namnożonego wirusa z komórek i przechodzeniu do płynu odżywczego. Wykazał to również *Mussa* dla szczepu zjadliwego oraz lentogenicznego szczepu F_{107} . Natomiast *Henle* i współpracownicy (1958) podają, że w warunkach trwałego zakażenia hodowli lokalizacja wirusa pomoru rzekomego może być całkowicie odmienna i wtedy tylko 1—10% jego ilości stwierdza się w płynie, a reszta związana jest z komórkami.

Pięciokrotne zamrażanie i rozmrażanie hodowli zakażonej wirusem nie wpłynęło na jego miano, podobnie jak to ma miejsce przy tym wirusie namnażanym w zarodkach kurzych (*Mussa* — 1960).

Materiał wirusowy uzyskiwany z hodowli tkankowych nie wykazywał właściwości hemaglutynacyjnych w stosunku do krwinek kurzych. Na brak tych właściwości u wirusa pomoru rzekomego namnażanego w hodowlach tkankowych względnie ich znaczne osłabienie w porównaniu z wirusem namnażanym w zarodkach kurzych zwraca uwagę szereg autorów (Chaproniere i Pereira — 1955; Shimizu i współpracownicy — 1958; Chanock — 1955). Wydawało się, że wirus pomoru rzekomego wykazuje brak tych właściwości przy namnażaniu go w hodowlach tkanek ssaków, jednak podobne zjawisko stwierdzano również w hodowlach tkanek zarodka kurzego (Tyrrrel — 1955). Russew na 4 badane szczepy tylko u 1 (zjadliwego) stwierdził pojawienie się hemaglutyniny. Goldwasser i Kohn (1957) otrzymali dodatnią reakcję HA jedynie przy stworzeniu specjalnych warunków hodowli. Z drugiej strony Hallauer (1958) wykazał wysokie miano HA wirusa z hodowli tkanek ludzkich, a Russew z hodowli nerki bydła dorosłego. Można ogólnie stwierdzić, że jedynie szczepy zjadliwe namnażane w hodowlach dają miano HA zbliżone do wartości uzyskiwanych z wirusem zarodkowym. Różnice miana otrzymywanego przez różnych autorów można tłumaczyć odmiennością metodyki hodowli, wyborem tkanki, a szczególnie składem płynu odżywczego utrzymującego.

Dla wyjaśnienia braku właściwości hemaglutynacyjnych wirusa namnażanego w opisanych doświadczeniach własnych badano używany płyn utrzymujący na obecność inhibitorów hemaglutynacji, a po ich stwierdzeniu stosowano zabiegi mające na celu ich usunięcie. Niszczenie inhibitorów działaniem nadjodanu sodowego (NaJO_4), które według Granoffa (1955) umożliwia wykrycie nawet bardzo małych stężeń hemaglutynin u wirusa grypy, nie dało efektu. Stosowano również działanie eteru na płyn hodowli tkankowej, gdyż wiadomo z doświadczeń własnych, że zabieg taki podnosił znacznie aktywność hemaglutynacyjną kilku badanych szczepów wirusa pomoru rzekomego, namnażanych w zarodkach kurzych; również ten sposób dał wyniki ujemne.

Celem zniszczenia inhibitorów w płynie utrzymującym stosowano także poddawanie go działaniu wyższych temperatur przed użyciem do hodowli. Skuteczne okazało się ogrzewanie przez godzinę w 100°C , co wyrażało się znacznym spadkiem ilości inhibitorów. Ogrzewanie płynu umniejsza co prawda jego wartość jako płynu odżywczego utrzymującego, jednak jest on jeszcze w pełni przydatny dla zapewnienia odpowiednich warunków dla komórek przez okres, który wystarcza dla obserwacji zmian morfologicznych przy namnażaniu wirusa. W hodowlach na takim płynie uzyskano dodatni odczyn hemaglutynacji. Stwierdzano go od 4 do 11 dnia po zakażeniu; miano było niskie i odpowiadało wartościom uzyskanym przez Chanocka (1955) dla innych szczepów tego wirusa przy namna-

żaniu w hodowli nerki małpy. Dodatnią reakcję HA uzyskano również przy użyciu płynu HSH. Dane te wskazują, że szczep Roakin przy namnażaniu się w hodowli nerki świni wykazuje stosunkowo słabsze właściwości hemaglutynacyjne niż wirus zarodkowy, i że w związku z tym obecność inhibitorów w płynie hodowli uniemożliwia ich wykazanie.

Dalszą metodą, mającą na celu usunięcie inhibitorów z płynu zawierającego wirus, było jego częściowe oczyszczenie za pomocą riwanolu. Przydatność tej metody wypróbowano najpierw przy oczyszczaniu wirusa zarodkowego. Celem jej nie było uzyskanie wysoce stężonych preparatów wirusa, a jedynie próba usunięcia pozawirusowych substancji uniemożliwiających wykazanie hemaglutynin. Wyniki uzyskane z wirusem zarodkowym były zachęcające, gdyż otrzymany materiał przy 18-krotnie mniejszej ilości N ogólnego wykazywał 4-krotnie wyższe miano HA w porównaniu z wirusem wyjściowym. Jednakże przy oczyszczaniu tą metodą wirusa z hodowli tkankowej (szczep RH) nie udało się usunąć inhibitorów i wykazać hemaglutynin w żadnej z frakcji.

Reakcja hemadsorpcji w hodowlach z płynem odżywczym HSH dawała dodatnie wyniki. Umożliwia to w sposób prosty określanie zakażenia hodowli, w których efekt cytopatogeny jest słaby lub maskowany przez szybko występujące zmiany morfologiczne komórek na skutek właściwości samego płynu utrzymującego.

Przy badaniu zjadliwości szczepu z hodowli tkankowych (RH) stwierdzono na zarodkach niższą wartość LD_{50} oraz nieznaczne przedłużenie średniego czasu obumierania w porównaniu ze szczepem wyjściowym, co pozwala na zaszeregowanie szczepu RH do szczepów mezogenicznych. Również aktywność aldolazy dla obu szczepów jest taka sama. Podstawą użycia odczynu aldolazowego było doniesienie *Smitha i Kuna* (1954), którzy stwierdzili wzrost aktywności aldolazy płynu omocznego zarodków zakażonych wirusem pomoru rzekomego oraz praca *Mierzewskiego* (1961), wskazująca na jej zależność od zjadliwości szczepu.

Natomiast znaczne różnice wykazano przy użyciu próby zjadliwości domózgowej (*IPI Hansona* — 1956) i domięśniowej dla piskląt jednodniowych. Wartości te dla szczepu wyjściowego potwierdzają jego mezogeniczny charakter, natomiast uzyskane dla szczepu RH z hodowli tkankowych kwalifikują go jako szczep lentogeniczny.

Szczep RH wykazywał dobre działanie uodporniające u szczepionych domięśniowo kurcząt, przy czym poziom przeciwciał i czasu utrzymywania się ich w podanym okresie był podobny jak po szczepieniu wyjściowym szczepem Roakin. Przy dalszych badaniach ilościowych wykazano, że ImD_{50} szczepu wyjściowego jest wyższe i że różnica ta jest statystycznie znamienne.

Oceniając dane dotyczące nieszkodliwości i wartości uodporniających szczepu RH można stwierdzić, że namnażanie wirusa w hodowlach tkanekowych pozwala otrzymać materiał o dobrych właściwościach uodporniających, zupełnie nieszkodliwy. Stwierdzone obniżenie indeksu zjadliwości domózgowej do wartości charakterystycznej dla szczepu lentogenicznego świadczy, że materiał taki będzie całkowicie bezpieczny w użyciu, gdyż usuwa możliwości powikłań poszczepiennych, co jak wiadomo z obserwacji terenowych, występuje dość często przy użyciu szczepionki R. Zastosowanie tkanki heterologicznej umożliwia eliminację innych czynników zakaźnych dla drobiu, czego nie można uzyskać przy namnażaniu wirusa w zarodkach kurzych.

Piśmiennictwo obejmujące 42 pozycje podano przy pracy *in extenso*.

З. Ля р с к и

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА ROAKIN ВИРУСА NEW-CASTLE ПАССАЖИРУЕМОГО В ОДНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПОЧКИ СВИНЬИ

Резюме

Штамм Roakin азиатской чумы домашней птицы легко размножается и пассажируется в однослойной культуре клеток почки свиньи, причем его цитопатогенное действие является сравнительно слабым в применяемых условиях культуры. Титр вируса является низким, чем при размножении в куриных эмбрионах. Исследование динамики размножения вируса и его наличие в культуре в ранних и дальнейших пассажах, указывает на прогрессирующую адаптацию вируса тканью. Вирус, размножающийся в клетках культуры, быстро освобождается и переходит к питательной жидкости.

Отсутствие гемагглютинационных признаков вирусного материала из культуры связано с присутствием ингибиторов в применяемой фиксирующей питательной жидкости. При применении жидкости, подверженной действию температуры 100°C или жидкости другого состава, была получена положительная реакция Ha. Очищение с помощью риваноля оказалось методом, пригодным для вируса из аллантоисной жидкости эмбриона, результатом чего был рост титра Ha. Зато в случае вируса из тканевой культуры этот метод оказался безуспешным.

Тканевые культуры с жидкостью HSH, зараженные вирусом, проявляют гемадсорбцию. Средний срок отмирания эмбрионов, заражен-

ных штаммом RH, является лишь немного более продолжительным, чем после заражения исходным вирусом. Активность альдолазы в аллантаической жидкости является такой же.

Штамм RH, полученный путем мезогенических пассажей штамма Roakin в тканевых культурах, проявляет индекс интрацеребральной вирулентности, характерный для лентогенических штаммов. Иммунизационное качество штамма RH хорошее, а уровень антител и срок их удерживания является сходным со сроком после вакцинирования штаммом Roakin. ImD_{50} этого последнего штамма однако более высокий и разница статистически характерная.

Вирус, размноженный в тканевых культурах, имеет преимущества, указывающие на его пригодность для производства вакцины против азиатской чумы домашней птицы.

Z. L a r s k i

BIOLOGICAL PROPERTIES OF NEW CASTLE DISEASE VIRUS (ROAKIN STRAIN) AS PASSAGED IN THE MONOLAYER PIG KIDNEY'S TISSUE CULTURE

S u m m a r y

The New Castle disease Roakin strain can be easily multiplied and passaged in the monolayer pig kidney's tissue culture and its cytopathogenic effect is comparatively weaker under the applied conditions of virus cultivation in the tissue culture than when it is multiplied in the chicken embryo. The studies on the dynamics of virus multiplication and its viability in the tissue culture, in the first and following passages indicates the progressive adaptation of the virus to the tissue. Multiplying virus in the tissue culture releases itself quickly to the medium.

The lack of hemagglutination properties of the virus from tissue culture is connected with the presence of inhibitors in the medium, when medium imposed to 100°C temperature or when medium with different composition was applied, a positive HA reaction was observed. Rivanol purification was a useful method for the virus from amnion liquid of the chicken embryo because it increase the HA of the virus. However, in the case of a virus material from the liquid of tissue culture this method was without.

Tissue culture with HSH liquid, infected with virus showed the phenomenon of hemadsorption. The average surviving period of embryos infected with the RH strain is a little longer than after infection of the

outcoming virus. Also the activity of aldolase in the amnion liquid is the same.

The RH strain acquired through mesogenic passages of the Roakin strain in the tissue culture shows index of cerebral virulence characteristic for the lentogenic strains. The resistance of the RH strain is good and the level of antibodies and the period of their duration is similar to the one after vaccination with the Roakin strain. However ImD_{50} of this last strain is higher and the difference statistically significant.

The virus which is multiplied in tissue culture has qualities which make it useful for preparation of the vaccine against New Castle disease.