

KONRAD MALICKI, ELŻBIETA MALICKA*,
ANNA ŁADYŃSKA, MARCIN BANBURA

Morfologia i właściwości hemaglutynujące koronawirusa jelitowego cieląt*). I. Morfologia koronawirusa namnożonego in vitro

Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii i * Katedra Patologii Wydziału Weterynaryjnego
SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

Morphology and haemagglutinating activity of calf intestinal coronavirus. I. Morphology of coronavirus propagated in vitro

Coronavirus 800 (18) propagated in the lung cells of the calf foetus (16) was purified and concentrated by: a) differential centrifugation, b) precipitation with PEG-6000, c) repeated haemadsorption-elution assay (9). The samples were examined under a transmissive microscope after prior negative staining. There were found many virions (Fig 1 and 2) with a typical morphology of coronavirus (2, 12, 13, 14, 15, 17). Besides, there were observed some particles with internal nucleoprotein in the form of a spiral or S-shape, and empty particles (Fig 5) with bilateral concave surfaces (fig 6). Unusual peplomers forming short (Fig 7, 8) and long filaments (Fig 9, 10) were also seen. However, to identify these unusual structures as coronaviruses or coronavirus substructures (Fig 11; 12) it is necessary to employ a specific method using labelled antibodies.

Obecna znajomość budowy wirionu i hemaglutynujących zdolności jelitowych koronawirusów cieląt (1, 2, 12, 18) pozwala na ich taksonomiczne zaszeregowanie do rodziny *Coronaviridae* (11) i na laboratoryjne odróżnienie od innych jelitowych wirusów występujących u bydła (3, 10, 14, 15, 17). Niewiele wiadomo o morfologii i właściwościach koronawirusów cieląt w zależności od miejsca (kontynentu) izolacji (5), warunków namnażania *in vitro* (6, 14, 16), sposobu oczyszczania i zagęszczania (13, 15, 17) lub przechowywania. Koronawirusy jelitowe cieląt namnażane w hodowlach komórek dają na ogół niskie miano. Stąd koncentracja jelitowego koronawirusa cieląt w kombinowanych szczepionkach profilaktycznych nie jest w pełni satysfakcjonująca. Uzyskanie wyższych koncentracji wymaga zastosowania specjalnej techniki namnażania (6, 16) lub określonych sposobów oczyszczania i zagęszczania namnożonego koronawirusa (15). Poznanie cech morfologicznych koronawirusa namnażanego *in vitro* i towarzyszących mu strukturalnych elementów wirionowej natury może mieć istotne znaczenie dla oceny wyniku namnażania oraz oceny prawidłowości przebiegu procesów oczyszczania i zagęszczania.

Celem pracy było poznanie struktur morfologicznych, towarzyszących namnażaniu *in vitro* jelitowego koronawirusa i uzyskiwanych przy oczyszczaniu i zagęszczaniu materiału z hodowli, przez zastosowanie wirowania różnicującego, wytrącania za pomocą PEG-6000 lub kilkakrotną adsorpcję-elucję z użyciem erytrocytów szczura (9).

Materiał i metody

Koronawirus 800 (18), używany w równocześnie prowadzonych doświadczeniach nad hemadsorpcją-elucją (9), namnożono w butlach Roux w subkulturach komórek płodowych płuc cieląt (16). Płyn utrzymujący z hodowli z resztkami komórek wirowano wstępnie w wirówce WE-2, z szybkością 3000 obr./min. przez 10 min. Zebrany supernatant, po oznaczeniu miana HA, przeznaczono do dalszego oczyszczania i zagęszczania trzema metodami:

a) przez ultrawirowanie przy 100 000 g w ciągu 2 h, w rotorze kątowym 8×11, w wirówce VAC-602; uzyskany osad zawieszano w 0,2 ml PBS na probówkę wirówkową, po czym zawiesinę pulowano;

b) przez dodawanie PEG-6000 f-my Sigma, do koncentracji 10%, w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym. Po 2 h zawiesinę wirusa wirowano w rotorze wychylnym 3×35 przy 25 000 g przez 1 h. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w objętości 1 ml PBS na probówkę;

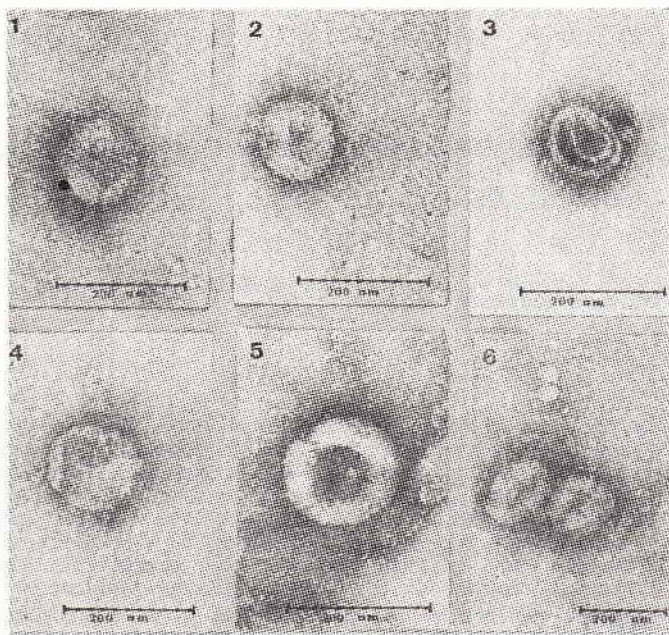
c) przez adsorpcję pięciu nowych porcji wirusa do tych samych erytrocytów szczura, stanowiących każdorazowo 1% powstałej zawiesiny oraz wykonanie trzech kolejnych elucji w temperaturze 37°C (9), w odpowiednio zmniejszonej objętości PBS.

Po ponownym oznaczeniu miana HA mikrometodą płytkową zawiesiny wirusa kontrastowano negatywowo solą sodową kwasu fosforowolframowego lub octanem uranylu i nakładano na siatki pokryte formwarem i napyłone węglem. Dokumentację sporządzano w mikroskopie elektronowym transmisyjnym JEM 100C.

Wyniki i omówienie

Zawiesina Koronawirusa 800 pasażowanego w subkulturach komórek płodowych płuc cieląt, ujawnia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym obecność zróżnicowanych struktur morfologicznych. Obok wirionów o wymiarach 120—160 nm, prezentujących typowe cechy morfologiczne koronawirusów (ryc. 1 i ryc. 2), odpowiadających dotychczasowemu opisom koronawirusów pochodzących z natywnego materiału (2, 12, 13, 14, 15, 17), można obserwować także inne wiriony — o różnym ułożeniu wewnętrznej nukleoproteiny, np. w postaci spirali (ryc. 3), litery S (ryc. 4) lub wiriony niekompletne, pozbawione nukleoproteiny (ryc. 5). Równie często można zaobserwować wiriony o odmiennym ukształtowaniu powierzchni, np. dwustronnie wklęsłe (ryc. 6) lub z niezwykle ukształtowanym peplomerem, w postaci krótszej (ryc. 7, ryc. 8) lub dłuższej, segmentowanej wypustki (ryc. 9, ryc. 10). Pojedyncze segmenty o wymiarach ca 40 nm lub ich bardziej regularne skupiska, np. pakiety, grona i łańcuchy (ryc. 11, ryc. 12), występują niezależnie od zastosowanego systemu oczyszczania, ale ze szczególnym nasileniem towarzyszą koronawirusowi, uzyskanemu przez oczyszczanie i zagęszczanie przy zastosowaniu PEG-6000. Identyfikacja tych struktur jako podjednostek koronawirionów lub jako materiału wytwarzanego w procesie koronawirusowej replikacji

*) Badania finansowane w C.P.B.P. 04.02., temat 1.6.10.



Ryc. 1 i 2. Typowe koronawiriony o wymiarach ca 160 nm; pow. 125 000 ×

Ryc. 3. Koronawirion ze spiralnym ułożeniem wewnętrznej nukleoproteiny; pow. 140 000 ×

Ryc. 4. Koronawirion z ułożeniem wewnętrznej nukleoproteiny w postaci litery S; pow. 124 000 ×

Ryc. 5. Koronawirion niekompletny; pow. 140 000 ×

Ryc. 6. Koronawiriony dwustronnie wklęsłe; pow. 80 000 ×

wymagałoby zastosowania dokładniejszej metody identyfikacji, np. użycia swoistych, znakowanych przeciwciał. Przy wirowaniu w gradientach sacharozy lub chlorku cezu (5, 15), struktury takie ulegają eliminacji.

Wiadomo, że jelitowe koronawirusy replikują w różnych komórkach, np. w pęcherzykowych makrofagach (7). Stopień uszkodzenia takich komórek zależy od intensywności wirusowej inwazji. Pojawianiem się różnych niekompletnych cząstek koronawirusa tłumaczy się obserwowane niekiedy ujemne wyniki badania mikroskopowo-elektronowego przy dodatnich wynikach HE-HA (8). Własne obserwacje nad hemaglutynującymi właściwościami koronawirusa 800 wskazują, że nietypowe struktury nie podlegają hemadsorpcji do powierzchni erytrocytów szczura (9). Niektórzy autorzy (4) podkreślają rolę lizosomów w koronawirusowej morfogenezie. Wiadomo jednak, że lizosomalne enzymy nie są zdolne do degradowania koronawirionów.

Należy podkreślić, że odmiennie ukształtowane wiriony były obserwowane także u innych wirusów namnażanych *in vitro*, np. postaci tubularne u rotawirusów, wydłużone formy orto- i paramyksowirusów, formy sferyczne i nerkowate u torrowirusów (wirus Breda).

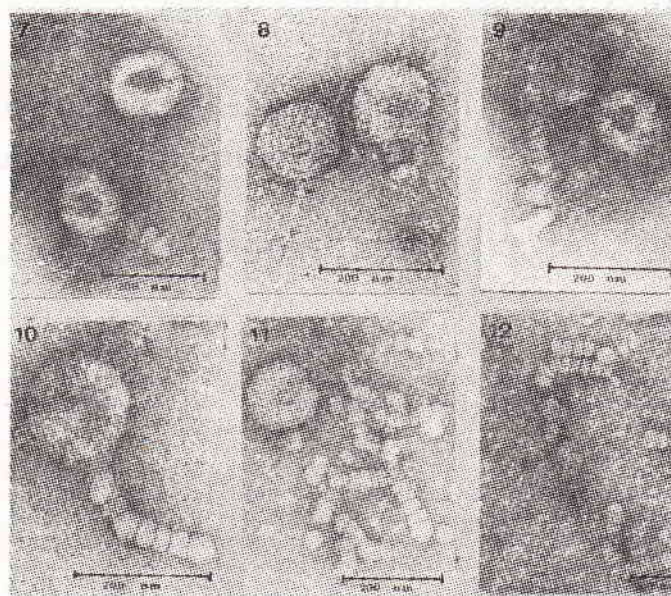
Wnioski

1. Koronawirus namnożony w hodowli komórek *in vitro* może wykazywać znaczniejsze zróżnicowanie cech morfologicznych, niż wynika to z opisu koronawirusów uzyskiwanych z natywnego materiału.

2. Identyfikacja struktur i materiałów powstających w procesie koronawirusowej replikacji i ocena ich biologicznych właściwości, wymagają zastosowania odpowiednich technik badawczych.

Piśmiennictwo

1. Akashi H., Inaba Y., Miura Y., Tokuhisa S., Sato K., Satoda K.: Vet. Microbiol. 5, 265, 1980.



Ryc. 7 i 8. Koronawiriony z niezwykle ukształtowanym peplomerem w postaci krótkiej segmentowanej wypustki; pow. 100 000 × i 125 000 ×

Ryc. 9. Koronawirion z niezwykle ukształtowanym peplomerem w postaci długiej segmentowanej wypustki; pow. 125 000 ×

Ryc. 10. Koronawirion z segmentowanym peplomerem; pow. 140 000 ×

Ryc. 11. Pojedyncze segmenty o wymiarach ca 40 nm w nieregularnych skupiskach i łańcuchach; pow. 100 000 ×
Ryc. 12. Skupisko segmentów w postaci pakietu; pow. 50 000 ×

2. Bridger J. C., Woode G. N., Meyling A.: Vet. Microbiol. 3, 101, 1978.
3. Dea S., Roy R. S., Begin M. E.: Amer. J. Vet. Res. 41, 23, 1980.
4. Ducatelle R., Hoorens J.: Arch. Virol. 79, 1, 1984.
5. Laporte J., Bobulesca P.: w: Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Meulen V., Siddell S., Wege H., Plenum Press, New York 1981, s. 181.
6. Laporte J.: C. R. Acad. Sc. Paris 290, 623, 1980.
7. Laude H., Cherley B., Geiff J.: J. gen. Virol. 65, 327, 1984.
8. Mádř V., Stěpánek J., Pšikal J., Menšík J., Franz J., Valíček L.: Arch. Exper. Vet. med. 37, 277, 1983.
9. Malicki K., Ładyńska A., Malicka E.: Medycyna Wet. (w druku).
10. Malicki K., Malicka E., Bańbura M.: Medycyna Wet. 37, 736, 1981.
11. Matthews R. E. F.: Classification and Nomenclature of Viruses. Forth Rep. Internat. Committee on Taxonomy of Viruses, S. Karger, Basel 1982.
12. Mebus C. A., Sair E. L., Rhodes M. B., Twiehaus M. J.: Amer. J. Vet. Res. 24, 145, 1973.
13. Roseto A., Bobulesco P., Laporte J., Escaig J., Gaches D., Peries J.: J. gen. Virol. 63, 241, 1982.
14. Sharpee R. L., Mebus C. A., Bass E. P.: Amer. J. Vet. Res. 37, 1231, 1976.
15. Sair E. L., Rhodes M. B., White R. G., Mebus C. A.: Am. J. Vet. Res. 33, 1147, 1973.
16. Toth T. E.: Amer. J. Vet. Res. 43, 927, 1982.
17. Valente C., Fruganti G., Ciorda A., Galletti L.: Arch. Vet. Ital. 30, 22, 1979.
18. Wellemans G., Oycert W., Muijle F., Thoonen H., van Opdenboch E.: Vlamms Diergeneesk. Tijdschr. 45, 249, 1977.

Adres autora: prof. dr habil. Konrad Malicki, ul. J. Bruna 14 m. 20, 02-594 Warszawa

MAIR T. S., TAYLOR F. G. R., HILLYER M. H.: Autoimmunologiczna hemolityczna niedokrwistość u ośmiu koni. (Autoimmune haemolytic anaemia in eight horses). Vet. Rec. 126, 51-53, 1990 (10)

Autoimmunologiczną hemolityczną niedokrwistość zdiagnozowano u 8 koni w oparciu o wynik odczynu Coombsa. Objawy kliniczne obejmowały depresję (8), gorączkę (5) żółtaczkę i hemoglobinurię (3). U czterech zwierząt śledziona była powiększona. W trzech przypadkach choroba miała tło idiopatyczne, w 5 była ona następstwem nowotworzenia. Oprócz niedokrwistości często występowała aglutynacja krwinek czerwonych, anizocytoza, retikulocytoza, rzadziej wzrost wartości hematokrytu. W czterech przypadkach po stosowaniu deksametazonu w dawce 30-40 mg/dzień choroba ustąpiła.