

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézet, Budapest
és Szegedi Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézet, Szeged

HUMÁN ADENOVÍRUS TÖRZS TENYÉSZETÉBŐL IZOLÁLT PARVOVÍRUS VIZSGÁLATA

LENGYEL ANNA, TÓTH MIKLÓS, BÉLÁDI ILONA az orvostudományok doktora
és NÁSZ ISTVÁN az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1980. V. 15.

A humán adenovírusok interferont indukáló képességének vizsgálata során kimutattuk, hogy a vizsgált típusok mindegyike képes csirkesejtekben interferont indukálni (Béládi és Pusztai 1967), az interferonképződés mértéke azonban a különböző típusok esetében nem volt azonos. Legjobb induktornak a 12-es és 8-as típus bizonyult (Pusztai és mtsai 1969). Az interferon kísérletekhez használt egyik 12-es típusú vírustörzsben elektronmikroszkóppal kisméretű víruspartikulákat tudtunk kimutatni, s a törzs intenzív hemagglutinációs aktivitást mutatott humán és tengerimalac vörösvértestekkel. Közleményünkben beszámolunk azokról a kísérletekről, melyeket a kis víruspartikulák izolálására és közelebbi jellemzésére, valamint abból a célból végeztünk, hogy azok szerepét az interferon indukcióban bizonyítsuk vagy kizárjuk.

Anyagok és módszerek

Sejtenyészetek és vírustörzsek. Az adenovírus törzsek és a „kis partikulák” tenyésztésére és cytopathogen hatásának vizsgálatára monolayer HEp-2 sejteket használtunk. A tápfolyadék 5% borjúsavót és 0,25% lactalbumin hydrolysatumot tartalmazó Gey-oldat volt, melyet 252 µg/ml argininnel egészítettünk ki. Az interferon vizsgálatához primer csirkeembrió fibroblast és AV₃ sejteket használtunk. A human leukocyta szuszpenziót Cantell (1974) módszere szerint készítettük.

A 12-es típusú adenovírus törzsek közül a 12K jelzésű (Ad12K) Dr. K. Köhler-től (Max Planck Institut, Tübingen), a 12P jelzésű H. G. Pereirától (National Institute for Medical Research, London), a 12 Huie törzs a Karolinska Institutból (Stockholm) származott. E törzsek közül egyedül a 12K jelzésű tartalmazott „kis partikulát”. A 18-as típusú adenovírus törzset R. Wigandtól (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Homburg, Saar) kaptuk. Az interferon értékméréshez challenge-ként Sindbis és vesicular stomatitis vírust használtunk.

A 12K jelű adenovírus törzs tenyészetét 60 percen át 60 °C-on kezelve és 12P adenovírus ellen termelt nyúl immunsavóval neutralizálva az adenovírust inaktiváltuk, míg a tenyészetben jelenlevő „kis partikulák” biológiai aktivitása épen maradt. Az így nyert vírustörzset PVSz jelöléssel használtuk a továbbiakban.

Embrionált tojás oltása. A PVSz törzs $10^{7,5}$ TCID₅₀/0,1 ml infektivitású tenyészetéből 11 napos előkeltetett tyúktojás allantois üregébe 0,1 ml-t, amnionüregébe pedig 0,05 ml-t oltottunk. Háromnapos inkubálás után az allantois, ill. amnion folyadékából mintát vettünk és vizsgáltuk a hemagglutinációs aktivitást.

Immunsavók. A 12-es típusú adenovírustörzsek, ill. a szeparált és tisztított adenovírus antigének ellen nyulakban termeltünk immunsavót a már ismertetett módon (Lengyel és Nász 1970).

Hemagglutináció (HA) és hemagglutináció gátlási (HAG) próba. A vizsgálatokat Takátsy-féle mikrotitrátorban, esetenként WHO lemezekben végeztük 4 °C-on, 0,75—1%-os vörösvértest (vvt) szuszpenzióval. A HAG próbához a savóhígításokat 8 HA egységnyi (HAE) vírussal éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, majd hozzáadtuk a vvt-szuszpenciót és újabb 4 °C-on való inkubálás után olvastuk le az eredményt.

Interferon vizsgálatok. Az interferon indukció 48 órás primer csirkeembrió fibroblaszt kultúrákon történt a már leírt módszer szerint (Béládi és Pusztai 1967). A keletkezett interferon mennyiségi meghatározása Sindbis vírus challenge-dzsel, plakk-redukciós módszerrel történt (Pusztai és mtsai 1969). A PVSz vírussal human leukocyta szuszpenzióban is végeztünk interferon indukciós vizsgálatot Cantell (1974) módszere szerint. A keletkezett interferon mennyiségi meghatározása AV₃ sejteken történt VSV challenge vírussal, Limbro lemezekben.

Cytológiai vizsgálatok. A cytopathiás hatás vizsgálata 0,2 TCID₅₀/sejt PVSz vírus dozissal HEp-2 sejteken történt. A vírussal oltott állatok szerveiből formalinos fixálással, paraffinos beágyazással és haematoxylin-eozinos festéssel készítettünk szövettani metszeteket.

Állatoltások. 22 db újszülött és 13 db 3 hónapos hörsögöt oltottunk subcutan, intracerebralisán, ill. intrapulmonalisán, 23 db újszülött CFLP egeret subcutan és intrapulmonalisán, 15 db 2 hónapos CFLP egeret subcutan és intraperitonealisán, továbbá 6 db tengerimalacot subcutan és intraperitoneálisán PVSz vírussal. A vírusdózis intrapulmonalis és intracerebralis oltás esetén $5 \cdot 10^{6,5}$, a többi oltás esetén $10^{7,5}$ TCID₅₀ volt.

Ultracentrifugálás. A vírussal fertőzött sejt kultúrákból a sejteket alacsony fordulatszámú centrifugálással elválasztottuk, majd ötszöri fagyasztás-olvasztás után a sejttermelékeltávolítva a felülúszót arctonnal kezeltük. A vizes fázist 1,5 g/cm³ denzitású CsCl párnán 90 percen át 100 000x g-vel centrifugáltuk Janetzky VAC 60 ultracentrifugában. A vírustartalmú frakciókat

összegyűjtöttük és vagy kristályos CsCl-dal $1,38 \text{ g/cm}^3$ denzitásra beállítva 48 órán át, vagy preformált CsCl gradiensre rétegezve 24–36 órán át $120\,000\times g$ -vel centrifugáltuk MSE Superspeed 50 ultracentrifugában. Egyes esetekben Matsunaga és mtsai (1977) eljárását alkalmaztuk. A frakciókat a csövek aljának kiszúrásával nyertük, és éjszakán át $0,01\text{M}$ pH 8,1 Tris-pufferrel szemben dializáltuk.

Anioncserés kromatográfia. DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia) oszlopot használtunk $0,04 \text{ M}$ pH 8 Tris-pufferes közegben, lépcsőzetes elúciót alkalmazva a már leírt módszer szerint (Lengyel és Nász 1970). Az adenovírus antigének jelenlétét a frakciókban 5-ös típusú antihexon és 12 Huie víruspool elleni immunsavókkal, géldiffúziós precipitációval, a parvovírus tartalmat HA-val mutattuk ki. A frakciók extinkciós értékeit az UV tartományban Unicam SP800 spektrofotométerben határoztuk meg.

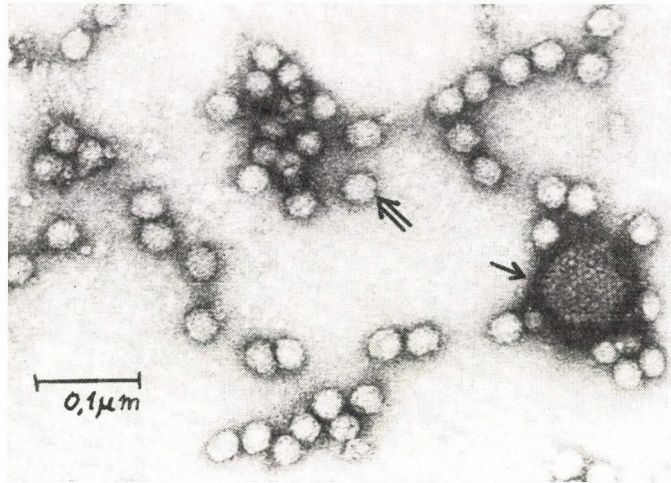
Gélszűrés. A kísérletekhez Sephadex G-200 és Sepharose 2B oszlopokat használtunk. Az eluens $0,5 \text{ M}$ NaCl-ot és $0,02\%$ Na-azidot tartalmazó pH 7,0 $0,01 \text{ M}$ foszfát-puffer volt. A frakciókat LKB Ultrorac frakciókolektorral gyűjtöttük és UV adszorpciójukat Uvicord II. közbeiktatásával regisztráltuk. Az oszlop kalibrálására Blue Dextran-t (Pharmacia), bovin serum albumint, kristályos RNase-t és fenolvöröst használtunk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok. A vizsgálatokat a SZOTE Központi Laboratóriumában JEOLCO 100B típusú elektronmikroszkóppal Dr. Molnár József és Dr. Nagy Erzsébet végezte, amiért ezúton is kifejezzük köszönetünket. A tisztított vírus szuszpenzióból készített preparátumokat 1% -os uranilacetáttal végzett negatív kontraszt festéssel, a vírussal fertőzött HEp-2 sejteket beágyazás után készített ultravékony metszetben ozmiumtetroxidos festés után vizsgáltuk.

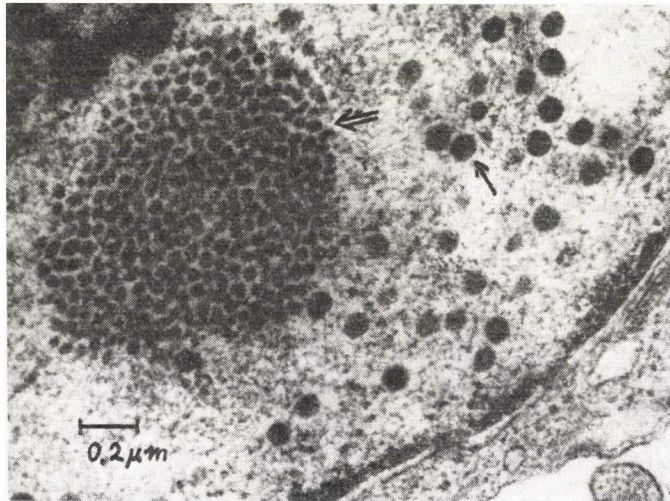
Eredmények

A humán 12-es típusú K jelzésű törzs sűrűségi gradiens centrifugálásakor az $1,32\text{--}1,34 \text{ g/cm}^3$ denzitású frakciókban az adenovirionnál jóval kisebb méretű, kb. 27 nm átmérőjű, ikozahedrálisnak látszó vírusrészecskéket figyeltünk meg elektronmikroszkópos vizsgálattal (1. ábra). E víruspartikulák a 12 K törzssel fertőzött HEp-2 sejtek ultravékony metszetében is megfigyelhetőek voltak. A 2. ábrán egy ilyen sejt magjának egy részletét mutatjuk be, melyben az adenovírusok mellett a kis vírusrészecskék egy csoportja látható.

A 12 K vírustörzs tenyésztete igen kifejezett hemagglutinációs aktivitást mutatott $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on emberi és tengerimalac vvt-ekkel és kevésbé kifejezettet sertés vvt-ekkel. Más speciestek vvt-jeivel nem kaptunk hemagglutinációt. Négy ilyen kísérlet eredményeit foglalja össze a 1. táblázat. A HA szobahőmérsékleten és $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on nem következett be és a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on agglutinált vvt-ekről is eluálódott a hemagglutinin, ha magasabb hőmérsékletre kerültek. Újra $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra



1. ábra Ad12K vírustörzs sűrűségi grádiens centrifugálással nyert $1,34 \text{ g/cm}^3$ denzitású frakciójának elektronmikroszkópos képe negatív kontraszt festéssel. A nyíl az adenoviriont, a kettős nyíl a „kis partikulát” jelzi



2. ábra Ad12K törzssel fertőzött HEp-2 sejt magjának elektronmikroszkópos képe. Jelzések: 1. 1. ábra

lehűtve a vírussal kezelt vvt-eket, az agglutináció újra bekövetkezett. A vírustörzs hemagglutináló képessége 60 percig tartó 60°C -os hőkezelés és 10 mg/ml trypsin-kezelés után is változatlanul megmaradt. A HA-t a 12 K törzs ellen termelt nyúlsvavók $1 : 2560$, ill. 5120 titerben gátolták, míg más 12-es típusú törzsek elleni nyúl immunsavók $1 : 10$ hígításban sem adtak pozitív HAG reakciót.

1. táblázat

Az Ad12K vírus hemagglutinációs spektruma

Vörösvértest faja	Kísérlet száma			
	1. 4 °C ⇌ 37 °C	2. 4 °C ⇌ 37 °C	3. 4 °C ⇌ 37 °C	4. 4 °C ⇌ 37 °C
Humán	512 ¹ <4	1024 4	1024 <4	2048 <4
Tengerimalac	512 <4	1024 <4	1024 <4	nt ²
Sertés	nt	nt	nt	256 <4
Csirke	nt	<20 <20	<20 <20	nt
Patkány	<20 <20	<20 <20	nt	nt
Majom	nt	nt	<20 <20	nt
Birka	nt	<20 <20	<20 <20	nt

¹ hemagglutinációs titer reciproka

² nt = nem történt vizsgálat

Kísérletek a „kis partikulák” elválasztására.

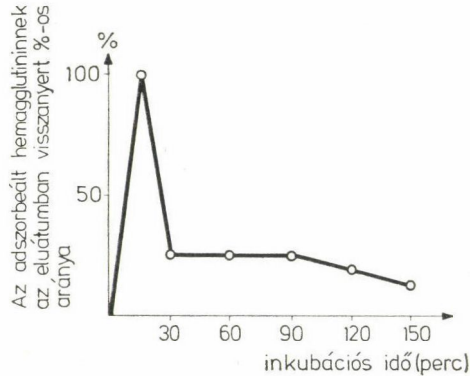
Miután a „kis partikulák” úszósűrűsége CsCl *sűrűségi grádiens centrifugálás* során azonosnak bizonyult az adenovíruséval, így ez a módszer nem volt alkalmas az adenovírustól való elválasztásra.

Membránszűrési kísérletekben 0,45, 0,22, 0,1 és 0,05 μ pórusnagyságú Millipore szűrőszorozatot alkalmazva, a legutóbbival sikerült az adenovírustól elválasztani a „kis partikulákat”, de csak igen nagy vírusveszteséggel. Így ezt a módszert nem találtuk alkalmasnak arra, hogy a további kísérletekhez elegendő mennyiségű vírust állítsunk elő.

Hemadszorpció — *elúció* módszerével el tudtuk választani a hemagglutináló „kis partikulákat” az adenovírustól. A 12 K vírus tenyészetét 2 órán át humán vvt-ekkel inkubáltuk 4 °C-on, majd a felülúszót centrifugálás után eltávolítottuk. A vvt-eket PBS oldatban resuspendálva és 37 °C-ra téve a hemagglutináló vírusrészecskék eluálódtak és centrifugálás után a felülúszóból visszanyerhetők voltak.

Az elúció mértékét a 37 °C-os inkubálás különböző időpontjaiban vizsgálva (3. ábra) azt találtuk, hogy a hemagglutinin maximális, 100%-os visszanyerése csak a 15. percben érhető el, továbbá növelve az inkubációs időt az eluátum HA titere csökken. Két órán át 37 °C-on inkubált vvt-ek felülúszójával HAG próbát végezve azt találtuk, hogy a felülúszó 1 : 64—1 : 128-as titerben gátolta a 12 K törzs agglutinációját, 8 HA egységnyi vírust használva a kísérletben. A vvt felülúszójában komplement-kötési reakcióval vvt-antigéneket tudtunk kimutatni MN vvt-antigén elleni immunsavóval. A felülúszót nagy fordulatszámú centrifugálással (10 000 g 30 percig) meg tudtuk szabadítani a HA gátló vvt-membrántöredékektől.

A „kis partikulákkal” reagáló vvt-receptorok tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy azok érzékenyek tripsinnel és receptorbontó enzimmal szemben. Humán vvt 20%-os suspensióját 20–30 mg/ml tripsinnel vagy 400 E/ml *Vibrio comma* neuraminidaseval kezelve 37 °C-on 1 órán át, a vvt-ek agglutinabilitása a 12 K törzsszel megszűnt.



3. ábra Az Ad12K vírustörzs 4 °C-on humán vvt-re adszorbeált hemagglutininjének elúciója a vvt-ről 37 °C-on

Ezek alapján a hemadszorpció-elúciós módszert tripszinkezeléssel kombináltuk, s ezzel jobb eredményt tudtunk elérni (2. táblázat). Az 1 órás elúciós idő után a felülúszót egy további órán át 5 mg/ml tripsinnel kezelve az eredeti vírustitert kaptuk vissza.

2. táblázat

Az Ad12K hemagglutininjének tisztítása hemadszorpció-elúció és tripszin-kezelés kombinációjával

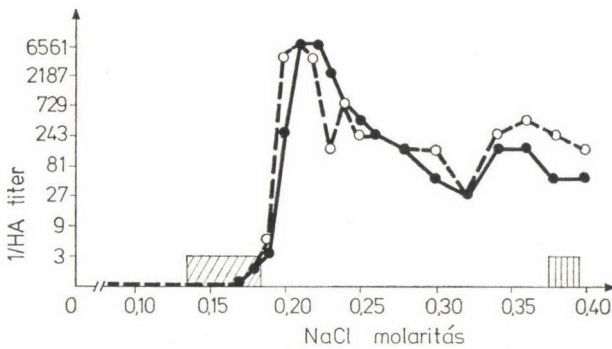
Tripszin kezelés	Eredeti Ad12K vírusanyag	Hemadszorpció (2h 4 °C) utáni felülúszó	Eluátum (1h 37 °C) a vörösvértestről
0	1024 ¹	< 4	256
5 mg/ml 1h	2048	64	2048

¹ a hemagglutinációs titer reciproka

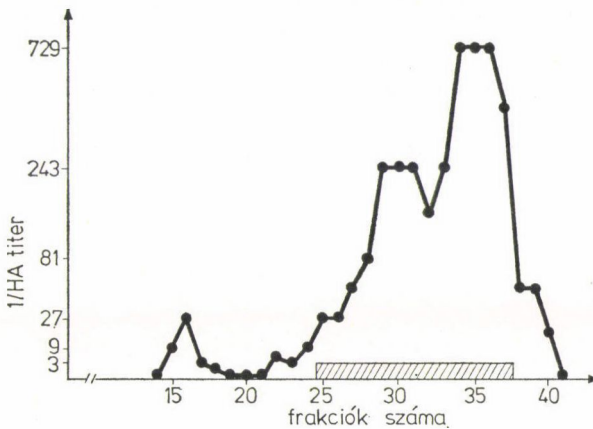
A tripszinkezeléssel kombinált hemadszorpció-elúcióval előállított anyagban immunológiai módszerekkel nem tudtunk adenovírus antigént kimutatni. Az eluátumot *anioncserés kromatográfiával* is megvizsgáltuk, és összehasonlítottuk az eredeti 12 K víruspoollal. A 4. ábrán a frakciókkal végzett HA próbák eredményeit ábrázoltuk. Az ábra mutatja a géldiffúziós precipitációval kimutatott csoport- és típuspecifikus adenovírus antigének helyét is a kroma-

togramban. Az eluátum egyáltalán nem tartalmazott adenovírus antigéneket, a hemagglutináló „kis partikulák” viszont azonos elúciós profilt mutatnak mindkét anyagban. Ezek elúciója közvetlenül a 12-es adenovírus hexonja után következik, 0,2 M NaCl koncentrációnál. A HA titerek arra mutatnak, hogy kétféle hemagglutinin van az anyagban, egy második, kisebb peak található 0,3 M NaCl koncentrációnál, és ez részben egybeesik az adenovírus típus-specifikus antigénjének elúciós pozíciójával.

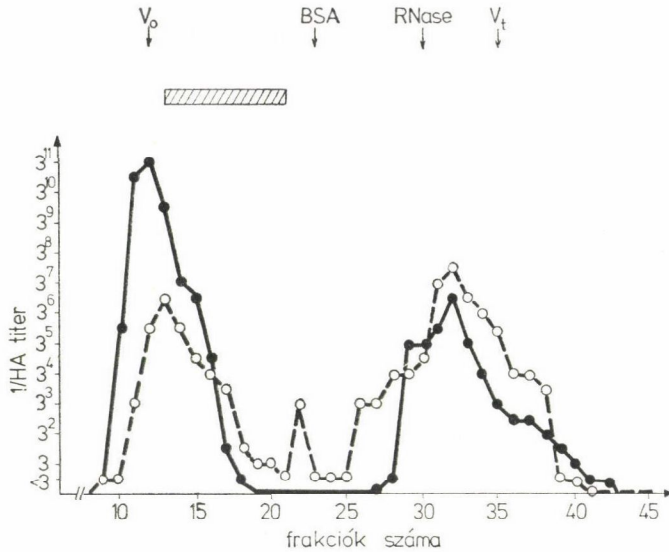
A hemadszorpció után visszamaradt vírusanyag kromatográfiás frakcióiban a csoport- és típus-specifikus adenovírus antigének változatlanul kimutathatók voltak, s a frakciók 280 nm-en mért extinkciói is csupán a 0,24–0,32 M



4. ábra Ad12K vírus (●—●) és a belőle hemadszorpció-elúcióval nyert, tisztított hemagglutinin (○—○) anionszerűs kromatográfiája DEAE Sephadex A-25 oszlopon. Lépcsőzetes elúció emelkedő koncentrációjú NaCl oldatokkal, tris pufferes (0,4 M, pH 8,0) közegben. Az Ad12K vírus frakcióiban géldiffúziós precipitációval kimutatott adenovírus antigének jelzése: [hatched] = hexon antigén, [striped] = fiber antigén



5. ábra Ad12K vírus gélszűrése Sepharose 2B oszlopon, 0,5 M NaCl tartalmú 0,01 M (pH 7,0) foszfát puffer eluenssel. V_0 = üres térfogat, V_t = teljes térfogat. Jelek: 1. 4. ábra



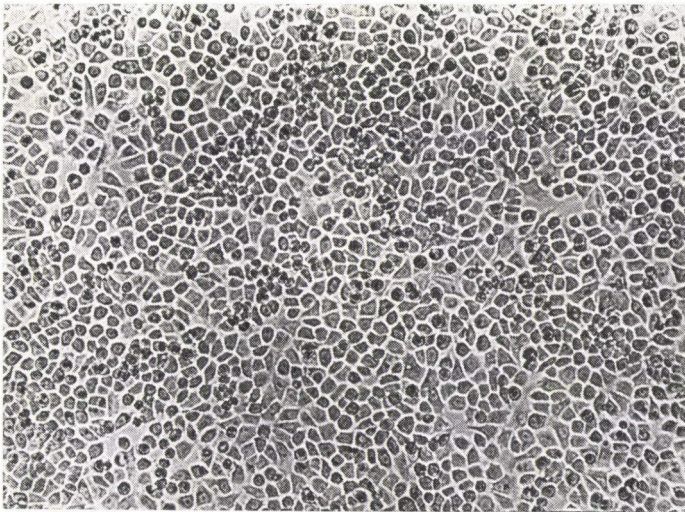
6. ábra Ad12K vírus és hemadszorpció-elúcióval tisztított hemagglutinin gélszűrése Sephadex G-200 oszlopon, 0,5 M NaCl tartalmú 0,01 M (pH 7,0) foszfát puffer eluenssel. BSA = bovin serum albumin elúciós maximuma RNase = kristályos ribonukleáz elúciós maximuma. Jelek: 1. 4. és 5. ábra

NaCl koncentrációjú frakciókban esökkentek, a többi frakcióban gyakorlatilag azonosak voltak a hemadszorpció előtti anyag frakcióiban mért értékekkel. Az adszorpció utáni anyag hemagglutinin-tartalmú frakciói viszont igen alacsony HA-titert mutattak.

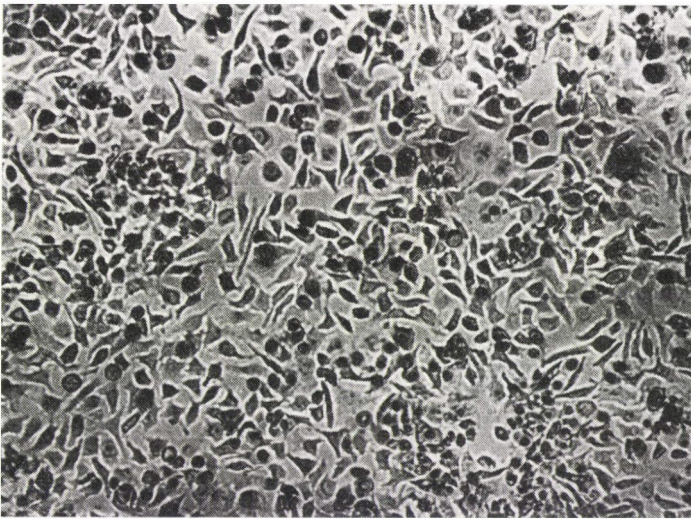
Gélszűrési kísérleteinkben a Sepharose 2B oszlop nem látszott alkalmasnak a parvovírus elválasztására, mert a hemagglutinin és a solubilis adenovírus antigének — elsősorban a hexon — azonos elúciós profilt mutattak (5. ábra). A HA titerek alapján itt is feltételezhető volt két különböző hemagglutinin jelenléte, bár ezzel a módszerrel egymáshoz igen közeli maximumokat produkáltak. Sephadex G-200 oszlopon már sokkal jobban elvált egymástól a két hemagglutinin (6. ábra), de az adenovírustól való szeparálásra ez sem volt alkalmas.

A PVSz vírustörzs előállítás, tenyésztése és jellemzése

A 12 K törzset 60 percen át tartó 60 °C-os hőkezelésnek vetettük alá, majd a „kis partikulákat” nem tartalmazó 12 P adenovírus törzs ellen nyúlban termelt immunsavóval kezeltük. Az így nyert vírusanyaggal HEp-2 sejtenyészeteket oltva *cytopathiás hatás* jelent meg a vírudózistól függően a 3–24. napon. A tenyészetek ebben az időpontban HA aktivitást is mutattak. Ez



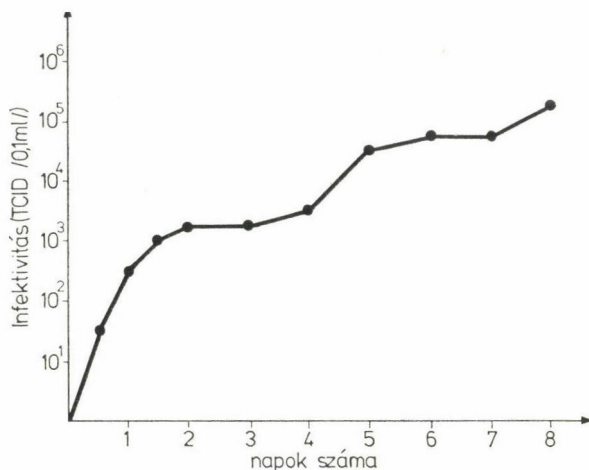
7. ábra Ép HEP-2 sejt kultúra mikroszkópos képe. Natív felvétel, 200-szoros nagyítás



8. ábra PVSz vírussal fertőzött HEP-2 sejtenyészet mikroszkópos képe 4 nappal a fertőzés után. Natív felvétel, 200-szoros nagyítás

utóbbi állandó kísérője volt a sejt károsító hatásnak olyannyira, hogy nem kifejezett vagy kérdéses cytopathiás elváltozás esetén HA próbával el tudtuk dönteni, hogy az adott kultúrában szaporodott-e a PVSz vírus.

A hő- és immunsavó kezeléssel izolált vírussal oltott HEP-2 kultúrákban a vírus hatás először a sejtek megnyúlásában és vakuolizációjában nyilvánult meg. Később a sejtréteg felszakadozott (7., 8. ábra), megritkult, végül pedig az



9. ábra A PVSz vírus szaporodása HEp-2 sejtekben. Inokulum: 0,1 TCID₅₀/sejt. A titerk mind az extra-, mind az intracelluláris infectivitást magukban foglalják

összes sejt levált a tenyésztőedény faláról. A vírus szaporodási görbét e sejt-kultúrában meghatároztuk: 0,1 TCID₅₀/sejt vírushatózissal fertőzve a csöveket meghatároztuk a különböző időpontokhoz tartozó infectív dózisokat (9. ábra). Az ábrán feltüntetett értékek mind az intra-, mind az extracelluláris vírushatóziséget magukban foglalják.

Az adenovírusok esetleges *helper hatásának* vizsgálatára azonos mennyiségű (0,1 TCID₅₀/sejt) PVSz vírussal és egyidejűleg 12 P, illetve 18-as típusú adenovírussal fertőztünk HEp-2 csövkultúrákat. Hét napos inkubáció után meghatároztuk a PVSz törzs infectív titerét. Mint a 3. táblázat mutatja, mindkét vírus típus *helperként* viselkedett. Már igen kis adenovírus mennyiség

3. táblázat

Adenovírusok hatása a PVSz vírustörzs szaporodására

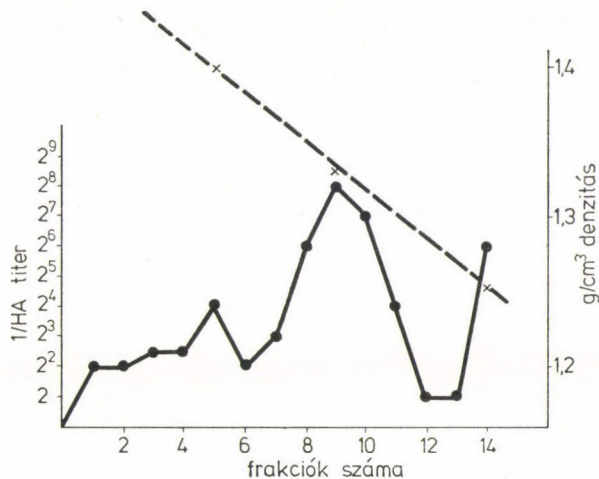
PVSz dózis	Vírus inokulum (TCID ₅₀ /sejt)		PVSz infectív titere az inkubáció 7. napján (TCID ₅₀ /0,1ml)
	Adenovírus		
	típus	dózis	
0,1	—		10 ^{4,75}
0,1	12P	0,5 × 10 ^{-2,5}	10 ^{7,5}
0,1	12P	0,5 × 10 ^{-3,5}	10 ^{6,5}
0,1	12P	0,5 × 10 ^{-4,5}	10 ^{5,5}
0,1	18	0,5 × 10 ⁻³	10 ^{5,75}
0,1	18	0,5 × 10 ⁻⁴	10 ⁵
0,1	18	0,5 × 10 ⁻⁵	10 ^{4,5}

(1 TCID₅₀/2 × 10⁵ sejt) is fokozta a PVSz titerét. A PVSz titere a helper vírus mennyiségének emelésével nőtt, 10^{2,5} TCID₅₀/2 × 10⁵ sejt Ad 12 közel ezerszeresére fokozta a parvovírus titerét a kontroll PVSz tenyészetéhez képest. Különböző más sejtenyészetekben adenovírus helper jelenlétében sem szaporodott a parvovírus (Hoggan, személyes közlés). Hasonlóképpen negatív eredménnyel zárultak az embrionált tyúktojásban való tenyésztésre végzett kísérletek.

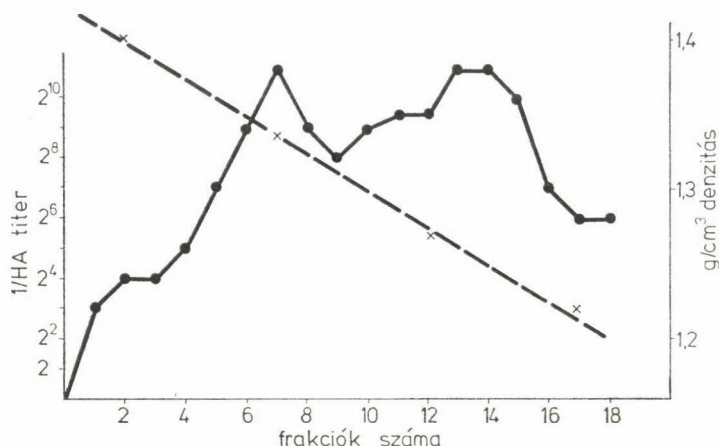
A PVSz izopiknikus CsCl gradiensben való centrifugálásakor az infekatív virionokat tartalmazó 1,40 és 1,34 g/cm³ denzitású hemagglutinin peakeken kívül egy harmadik, alacsonyabb, 1,26 g/cm³ körüli denzitású hemagglutinin peaket is találtunk (10. ábra). Az alacsony denzitású frakciókat összegyűjtve újabb 48 órás ultracentrifugálást végezve a hemagglutinin denzitása 1,25 g/cm³ volt (11. ábra).

A PVSz törzs elleni antitestek előfordulásának vizsgálatára HAG próbát végeztünk 18 egészséges emberből származó vérsavóval, 8 HAE vírust és humán 0 Rh+ vvt-et használva a reakcióhoz. A savók egyike sem gátolta a PVSz törzs hemagglutinációját. Tizenhárom patkány és 20 db sertés kaolinnal kezelt (Moore, 1962) vérsavójával kapott HAG titereket mutat a 4. táblázat. A patkánysavók váltakozó mértékű, a sertéssavók csak elhanyagolható mennyiségű antitestet tartalmaztak.

Állatkísérleteink során újszülött és kéthónapos egereket, újszülött, és háromhónapos hörsögöket, valamint tengerimalacokat oltottunk PVSz vírussal. Az állatok egy csoportjának szerveiből (máj, lép, tüdő, vese, agy) az oltást követő 10. 20. és 40. napon részben szövettani metszeteket, részben pedig homogenizátumot készítettünk s az utóbbiakat HEp-2 kultúrákra vittük. A sejtenyészeteken 30 napi inkubáció után sem észleltünk cytopathiás hatást és



10. ábra A PVSz vírus sűrűségi gradiens centrifugálása útján nyert frakciók HA titere (●—●) és denzitása (x---x)



11. ábra A PVSz vírus alacsony denzitású hemagglutininjének recentrifugálása Matsunaga és mtsai (1977) módszere szerint. Jelek: 1. 10. ábra

4. táblázat

PVSz vírus elleni hemagglutináció-gátló ellenanyagok előfordulása egészséges állatokban

HAG titer	Vizsgált savók száma	
	patkány	sertés
1 : 10 240	1	
1 : 5120	2	
1 : 1280	2	
1 : 640	2	
1 : 320	1	
1 : 160	1	
1 : 80	2	
1 : 40	—	4
1 : 20	2	—
<1 : 20	—	16

a tápfolyadékkal végzett HA próba is negatív eredményt adott. A szervek szövettani vizsgálata kismértékű lymphocytá beszűrődéstől eltekintve nem mutatott kórszövettani elváltozást.

Az oltott állatok másik csoportját 7 hónapon át figyeltük meg, ezalatt semmilyen kóros elváltozást nem találtunk. Ezután az állatokból vért vettünk, majd leöltük és felboncoltuk őket. Kórbonctani elváltozást egyikben sem találtunk. A levett szérumokkal kaolinosis kezelés után HAG próbát végeztünk, ennek eredményeit mutatja az 5. táblázat. Az állatok közül a tengerimalacok és a hörcsögök esetében kaptunk jelentősebb HAG titert, egereknél csak a 2 hónapos korban intraperitoneálisan oltott állatok mutattak, jóval kisebb mértékű, ellenanyagképzést.

5. táblázat

PVSz vírussal oltott állatok vérsavóinak HAG ellenanyag titeri az oltás után 7 hónappal

Állat kora	Oltás módja ¹	Egér		Hörszög		Tengerimalac	
		állatok száma	HAG ² titer	állatok száma	HAG titer	állatok száma	HAG titer
1 napos	s. c.	9	<20	1	160		
		4	20	2	320		
	i. pulm.			1	160		
2 hónapos vagy idősebb	i. p.	6	<20	1	320		
		4	20				
	s. c.	2	<20	1	320	1	160
		1	40			1	320
	i. p.	1	80				
		1	<20				

¹ rövidítések: s. c. = subcutan, i. pulm. = intrapulmonalis, i. p. = intraperitonealis, i. cer. = intracerebralis

² reciprok érték

Interferont indukáló képesség

A PVSz interferont indukáló képességét primer csirkeembrió fibroblast sejtekben többirányú vizsgálattal tisztáztuk.

Hemadszorpció-elúcióval (HE) tisztított, hőkezelt (HK) 12 K adenovírus törzsszel és PVSz vírussal végzett kísérletek eredményeit mutatja a 6. táblázat.

6. táblázat

Interferon-indukációs kísérletek az Ad12K vírustörzsszel csirkeembrió fibroblast sejtekben

Kísérlet száma	Indukcióhoz használt vírusanyag	Interferon titer
1.	Ad12K hemadszorpció utáni eluátum (HE)	4 ¹
	Ad12P	4096
	Ad12P + HE Ad12K	4096
2.	Ad12K hőkezelt 56 °C-on 40' (HK)	<4
	Ad12P	2048
	Ad12P + HK Ad12K	2048
3.	PVSz	<2
	Ad12P	2048
	Ad12P + PVSz	2048

¹ reciprok érték

Az eluátum önmagában csak minimális interferon indukciót mutatott és a 12 P törzs interferon indukcióját sem befolyásolta számottevően.

Az 56 °C-on 40 percen át hőkezelt (HK) 12 K adenovírus törzs önmagában nem indukált mérhető mennyiségű interferont, és nem befolyásolta a 12 P törzs interferon indukcióját, és ugyanezt az eredményt adta a PVSz törzs is. Hasonlóképpen negatív eredményt kaptunk human leukocytákkal végzett interferon indukciós kísérleteinkben a PVSz vírustörzssel.

Megbeszélés

Az adenovírusok interferont indukáló képességének vizsgálata során egyik legjobb inductornak bizonyult 12-es típusú törzsben kis méretű ikozahedrális víruspartikulákat mutattunk ki (1. ábra). Hasonló morfológiát a picorna és a parvovírus család vírusspeciensei mutatnak. A PVSz vírustörzs morfológiai, biológiai, fizikai, kémiai tulajdonságai egyértelműen arra mutatnak, hogy a vírus a Parvoviridae család Parvovirus genusába tartozik (Bachmann és mtsai 1979, Nász és Lengyel 1979).

Miután a vírustörzset adenovírus mellett találtuk és humán vvt-ekkel kifejezett HA-t kaptunk, első feltételezésünk az volt, hogy az adeno-associated vírus (AAV) humán 4. vagy bovin (Ito és Mayor 1968, Luchsinger és mtsai 1970) típusáról lehet szó. Minthogy a későbbiekben a törzset sikerült az adenovírussal szeparáltan, önmagában is szaporítani, ez a feltevés megdőlt. A törzset 12-es típusú humán adenovírus törzsből izoláltuk, az adenovírust pedig permanens humán sejt kultúrákban (HEp-2, HeLa) tartottuk fenn. Humán sejtenyészetekből gyakran mutatnak ki parvovírus kontaminációt (Siegl és mtsai 1971, Hallauer és mtsai 1972). A PVSz törzs hemagglutinációs tulajdonságai bizonyos mértékben eltérnek más parvovírusokéitól (Hallauer és mtsai 1972, Tinsley és Longworth 1973, Siegl 1976), de ugyanazon vvt-receptorokhoz kapcsolódnak, mint azok (Hallauer és mtsai 1972).

A vírustörzs a vizsgált sejt kultúrák közül csak a HEp-2 sejt vonalban szaporodott. Szaporodási görbéje (9. ábra) nem tér el más parvovírusok szaporodási görbétől (Salzman és mtsai 1972, Rhode 1973). A PVSz törzs más vírus jelenléte nélkül, önmagában képes volt szaporodni a HEp-2 kultúrákban, így a defektív AAV csoportba való tartozása kizárható volt. Ugyanakkor a 12-es és 18-as típusú adenovírussal együtt tenyésztve a törzset (3. táblázat) magasabb vírushozamot kaptunk. Az adenovírusok „helper” hatását más, nem defektív parvovírus törzsekkel kapcsolatban is ismerik (Ledinko és Toolan 1968).

A HA tulajdonságok alapján (1. táblázat) az általunk talált vírustörzs egyik ismert parvovírus speciessel sem azonosítható (Siegl 1976). Miután a patkány vvt-eket nem agglutinálja, így a „hamster osteolytic” csoportba

(Kilham rat, H-1, H-3, RTV, HB, X₁₄ vírus) nem tartozik (Toolan 1967, Hallauer és mtsai 1972), és nem lehet az MVM, PPV, KBSH, TVX vírusok egyikével sem azonos (Bachmann 1971). A vírustörzs agglutinációja tengerimalac vvt-ekkel arra utal, hogy a canin és felin parvovírusoktól is különbözik. A HT és HER₅₂ parvovírusok viszont a humán vvt-eket nem agglutinálják, így azok sem jöhetnek szóba. A Kirk és a HS-3 vírus agglutinálja ugyan a humán és tengerimalac vvt-eket, de ez a reakció nemcsak 4 °C-on, hanem 37 °C-on is végbemegy (Berquist és mtsai 1972, Mircovic és mtsai 1971), így ezekkel sem találtunk teljes analógiát.

A parvovírus törzset 12-es típusú adenovírus tenyésztésében találtuk. E típus a Rosen (1960) szerint 3. hemagglutinációs alcsoportba tartozik és a patkány vvt-ek részleges agglutinációját okozza. Kismértékben ezen kívül a humán vvt-eket is agglutinálhatja (Norrby és Ankerst 1969), ez azonban magasabb hőmérsékleten is végbemegy, és igen labilis a hemagglutinin 4 °C-on, így nem látszott valószínűnek, hogy a 12 K törzs nagyfokú HA aktivitása adenovírus komponenshez kötött. Erre utaltak a különböző 12-es típusú adenovírus törzsek elleni immunsavókkal kapott HAG eredmények is. A kérdés végleges tisztázása a kromatográfiás kísérletekkel sikerült.

Az anioncserés kromatográfiában (4. ábra) az adenovírus antigének elúciós sorrendje megegyezik az irodalmi adatokkal (Norrby és Ankerst 1969). A parvovírus hemagglutinin stabil elúciós tulajdonságokat mutatott, és a HA eredmények arra utalnak, hogy ez nem egységes, hanem kétféle populációból tevődik össze. Erre utalnak gélszűrőssel kapott eredményeink is (5. és 6. ábra). Feltételezhető, hogy nemcsak a víruspartikulák, hanem annak kisebb részei, esetleg a fehérjeburkát alkotó alegységek is rendelkeznek HA képességgel. Hasonló heterogenitást más parvovírus törzsekkel is kimutattak (Neurath és mtsai 1969).

A hemadszorpciós-elúciós módszer a kromatográfiával kombináltan alkalmasnak látszott a parvovírusok adenovírustól való szeparálására. Miután azonban sikerült a parvovírust önmagában is tenyészteni, a későbbiekben ezt a PVSz törzset használtuk kísérleteinkhez.

Sűrűségi gradiens centrifugálással az infekzív PVSz virionok 1,4 és 1,34 g/cm³ körüli denzitásúaknak bizonyultak. A virionok hemagglutinációs aktivitással is rendelkeztek, ami a könnyebb partikuláknál kifejezettebb volt, mint a nehezeznél. Kimutattunk egy harmadik, alacsony denzitású hemagglutinint is (10. és 11. ábra) 1,25 g/cm³ körül, mely feltehetően szolubilis komponensnek felel meg. Ez egybevág a gélfiltrációval kapott eredményekkel. Utóbbiban az egyik hemagglutinin az üres térfogatban jelent meg (6. ábra), így a virionoknak felelhet meg. A másik hemagglutinin elúciója csak a teljes térfogatot megelőző frakciókban következett be. Ennek magyarázata többféle lehet.

A különböző parvovírusok struktúrfehérjeinek (VP-1, VP-2, VP-3) molekulásúlya 57 000 és 85 000 d között található (Bachmann és mtsai 1979,

Pritchard és mtsai, 1978), ezeknek tehát a hemagglutinin nem felelhet meg. A Parvoviridae család egyes vírusairól kimutatták, hogy polipeptidjeik prekursor proteinekből alakulnak ki (Johnson és mtsai 1977), egyes esetekben a V-0-nak nevezett, 120 000 molekulásúlyú prekursor fehérjéből, máskor a vírusfehérjék valamelyike a prekursora a többi struktúrproteinnek (Tattersall és mtsai 1976, Lubeck és mtsai 1979). E prekursorok lebomlásakor elképzelhető kis molekulásúlyú fehérjék képződése is. Kisebb molekulásúlyú vírusspecifikus polipeptideket kimutattak AAV esetében (Buller és Rose 1978), ezek azonban nem strukturális fehérjék, s így a különböző tisztítási eljárások után nem valószínű jelenlétük a PVSz preparátumokban. Mivel a struktúrfehérjék kialakulásában is feltételezik egy tripszinszerű enzim szerepét (Lubeck és mtsai, 1979), az sem zárható ki, hogy a tisztítási eljárások között szereplő tripszinkezelés hozza létre a kis molekulásúlyú fehérjetermékeket, melyek tartalmazzák a hemagglutinációban résztvevő aktív csoportokat. Végül még annak a lehetősége is fennáll, hogy a magyarázat a PVSz törzs nagyfokú adheziós készségében rejlik, amit a vvt membrántörredékekkel kapcsolatban kimutattunk és a hemagglutinin elúciójának elnyúlása a Sephadex részecskékhez való intenzív kötődés, nem pedig az alacsony molekulásúly következménye. Egybevetve az ultracentrifugálás, az anioncsérés kromatográfia és a gélfiltráció eredményeit, mindenesetre arra a következtetésre juthatunk, hogy a PVSz törzs hemagglutinációjában mind a virion, mind pedig valamely szolubilis faktor is részt vesz.

A parvovírus törzs előkeltetett tojásban és különböző laboratóriumi állatokban nem szaporodott, állatpathogenitással nem rendelkezett, a beoltott állatokban azonban nagyobb részét HAG ellenanyagok képződtek ellene (5. táblázat). Egészséges patkányokban PVSz elleni HAG ellenanyagok fordulnak elő (4. táblázat), emberekben nem találtunk ilyen antitesteket.

Mintegy célunk elsősorban a parvovírus törzs interferon indukciójában játszott esetleges szerepének vizsgálata volt, legfontosabbnak e kérdés tisztázását tartottuk. Mint eredményeinkből kitűnik (6. táblázat) a 12 K törzs interferon indukciójában a parvovírus szerepe kizárható volt, és az izolált, adenovírus mentes parvovírus önmagában nem indukált interferont csirkeembryo fibroblast és humán leukocytá kultúrákban, s nem fokozta az adenovírus által indukált interferon mennyiségét sem.

Eredményeinket egybevetve a szerológiai vizsgálatokban kapottakkal (Hoggan, személyes közlés) az általunk humán 12-es típusú adenovírus törzs tenyészetéből izolált PVSz vírustörzset a Kirk és a HS-3 parvovírus törzsekhez közelálló, nem defektív parvovírusnak tartjuk.

Összefoglalás

Egyik 12-es típusú humán adenovírus törzsünkben elektronmikroszkópos vizsgálattal kisméretű, ikozahedrális víruspartikulákat találtunk. E vírusok intenzív hemagglutinációs aktivitással rendelkeztek, a fertőzött sejtek magjában szaporodtak, úszósűrűségük 1,4 és 1,34 g/cm³ volt. Megfelelő módszerekkel sikerült a vírust az adenovírustól elválasztani és tisztán előállítani. Meghatároztuk a törzs különböző fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságait, s ezek alapján megállapítottuk, hogy az a Parvoviridae családba tartozó, nem defektív vírus, mely szerológiai rokonságban áll a rágsálók két, a Parvovirus genusba tartozó, vírustörzsével.

IRODALOM

- Bachmann, P. A.: Zbl. Vet. Med. **B18**, 80 (1971).
 Bachmann, P. A., Hoggan, M. D., Kurstak, E., Melnick, J. L., Pereira, H. G., Tattersall, P. és Vago, C.: Intervirolog. **11**, 248 (1979).
 Béládi I. és Pusztai, R.: Z. Naturforsch. **22b**, 165 (1967).
 Berquist, K. R., Maynard, J. E., Sheller, M. és Schable, C. A.: J. infect. Dis. **126**, 203 (1972).
 Buller, R. M. L. és Rose, J. A.: J. Virol. **25**, 331 (1978).
 Cantell, K., Hirvonen, S., Mogensen, K. E. és Pyhälä, L.: In Vitro Monograph **3**, 35 (1974).
 Hallauer, C., Siegl, G. és Kronauer, G.: Arch. ges. Virusforsch. **38**, 366 (1972).
 Ito, M. és Mayor, H. D.: J. Immunol. **100**, 61 (1968).
 Johnson, F. B., Thomson, T. A., Taylor, P. A. és Vlazny, D. A.: Virology **82**, 1 (1977).
 Ledinko, N. és Toolan, H. W.: J. Virol. **2**, 155 (1968).
 Lengyel, A. és Nász, I.: J. Virol. **6**, 406 (1970).
 Lubeck, M. D., Lee, H. M., Hoggan, M. D. és Johnson, F. B.: J. gen. Virol. **45**, 209 (1979).
 Luchsinger, E., Strobbe, R., Wellemans, G., Dekegel, D. és Sprecher-Goldberg, S.: Arch. ges. Virusforsch. **31**, 390 (1970).
 Matsunaga, Y., Matsuno, S. és Mukoyama, J.: Infect. Immunity **18**, 495 (1977).
 Mirkovic, R. R., Adamova, V. A., Boucher, D. W. és Melnick, J. L.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **138**, 626 (1971).
 Moore, A. E.: Virology **18**, 182 (1962).
 Nász, I. és Lengyel, A.: Biológia **27**, 3 (1979).
 Neurath, A. R., Stasny, J. T., Rubin, B. A., Hartzell, R. W. és Weiner, F. P.: J. gen. Virol. **5**, 451 (1969).
 Norrby, E. és Ankerst, J.: J. gen. Virol. **5**, 183 (1969).
 Prichard, C., Patton, J. T., Bates, R. C. és Stout, E. R.: J. Virol. **28**, 20 (1978).
 Pusztai, R., Béládi, I., Bakay, M. és Mucsi, I.: J. gen. Virol. **4**, 169 (1969).
 Rhode, S. L.: J. Virol. **11**, 856 (1973).
 Rosen, L.: Amer. J. Hyg. **71**, 120 (1960).
 Salzman, L. A., White, W. L. és McKerlie, L.: J. Virol. **10**, 573 (1972).
 Siegl, G.: Virology Monographs **15**, Springer Verlag, Berlin (1976).
 Siegl, G., Hallauer, C., Novak, A. és Kronauer, G.: Arch. ges. Virusforsch. **35**, 91 (1971).
 Tattersall, P., Caute, P. J., Shatkin, A. J. és Ward, D. C.: J. Virol. **20**, 273 (1976).
 Tinsley, T. W. és Longworth, J. F.: J. gen. Virol. **20** (sup) 7 (1973).
 Toolan, H. W.: Amer. J. Hyg. **71**, 120 (1960).