

Züchtung von Poliovirus Typ 3 im Leberexplantat eines Kaltblüters (*Lacerta viridis*)

(Kurze Mitteilung)

Von

L. Schindarow, Sofia

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 12. Februar 1965)

Schindarow und *Tonew* (1, 2) berichteten bereits über die erfolgreiche Züchtung von Vacciniavirus und des Virus des Abortus der Schafe im explantierten Lebergewebe der Eidechse (*Lacerta viridis*). Im folgenden sollte untersucht werden, ob dieses Kaltblütergewebe auch für die Vermehrung von Poliovirus geeignet ist.

Material und Methoden

Präparierung des Gewebes. Die in kleine Fragmente geschnittene und von Blut gereinigte Leber von *Lacerta viridis* wurde in einer Salzlösung mit Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) 1–2 bis 24 Stunden bei 4° C gehalten. Die Aufbereitung des Gewebes geschah mit fraktionierter Trypsinisierung mit 0,25%iger Trypsinlösung Difco. Eine einleitende Trypsinisierung (2 bis 3 Stunden bei 30° C, unter 2- bis 3maligem Wechsel der Trypsinlösung) bezweckte, das Gewebe von Zelldetritus und Erythrocyten zu befreien. Von dem Augenblick an, wenn die Zellen sich abzulösen begannen, wurde die Trypsinisierung bei 32 bis 35° C weitergeführt. In einem Intervall von 15 bis 50 Minuten wurden jeweils die isolierten Zellen abgesondert und neues Trypsin zugefügt. Das gesamte Zellsediment wurde in neutraler Salzlösung gewaschen, in Nährmedium auf eine Zellkonzentration von 300.000/1 ml resuspendiert und in Mengen von 1,0 bis 1,5 ml in Röhrechen abgefüllt. Die Züchtung erfolgte bei 37° C.

Die ersten Proliferationserscheinungen setzten etwa nach 48 Stunden ein, wenn sich Grüppchen von kleinen epithelähnlichen Zellen und vereinzelte fibroblastenähnliche Zellen zeigten; um den 5. bis 6. Tag herum bildeten die proliferierenden Zellen eine kontinuierliche Zellschicht (Abb. 1). Das explantierte Gewebe besteht morphologisch überwiegend aus epitheloiden und spärlich vorhandenen fibroblastenähnlichen Zellen. Die epitheloide Komponente der Kultur ist durch zwei Zelltypen vertreten, nämlich kleine granu-

lierte, polygonale Zellen, die zu einer kontinuierlichen Zellschicht auswachsen, und größere, heller erscheinende, gleichfalls polygonale Zellen, die in Form kleiner Inseln in den Zellrasen eingelagert sind (Abb. 2).

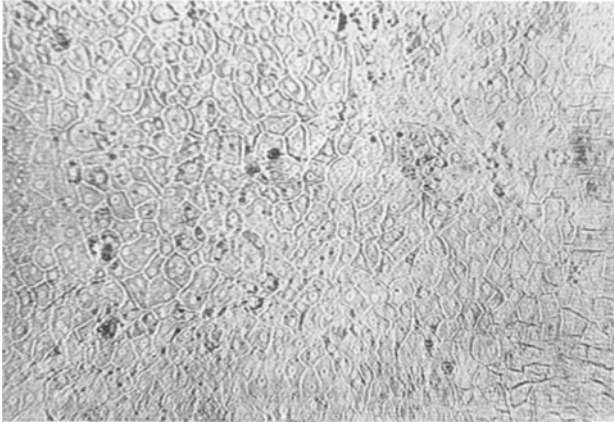


Abb. 1. Normale einschichtige Kultur von Eidechsenleber.

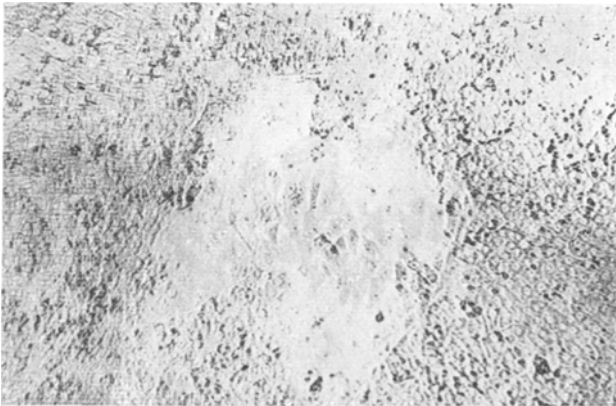


Abb. 2. Insel aus größeren epithelähnlichen Zellen mitten in der kontinuierlichen Schicht aus kleineren epithelähnlichen Zellen.

Nährmedium. Salzlösung (NaCl 6,5 g, KCl 0,14 g, CaCl₂ 0,12 g, MgSO₄ 0,2 g, bidestill. Wasser 1000 ml, 1% Phenolrotlösung 2 ml).

Kälberserum	65%
5% Laktalbuminhydrolysat	15%
Hühnerembryonalextrakt	10%
Antibiotika, pH 7,4 bis 7,6	10%

Virus. Poliomyelitis Typ 3 (Stamm Saukett) aus HeLa-Zellkulturen. Ausgangstiter 4,0 log ID₅₀/0,2 ml.

Die *Beimpfung der Zellexplantate* erfolgte mit je 0,2 ml unverdünnter bzw. in 10er Potenzen verdünnter Nährflüssigkeit (aus vorgängig eingefrorenen Zellkulturen) während einer Adsorptionszeit von 30 Minuten bei Zimmer-temperatur. Sämtliche Röhren erhielten hierauf 1,5 ml Nährmedium und wurden bei 37° C inkubiert.

Nach der 10. Passage wurde das Kulturvirus auf HeLa-Zellen übertragen und im *Neutralisationstest* unter Verwendung eines Polio-Typ-3-spezifischen Immunsereums identifiziert.

Die erzielten *Versuchsergebnisse* sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1. Züchtung von Poliovirus Typ 3 in Explantaten von Eidechsenleberzellen

Passagen		Virusnachweis*	Passagen		Virusnachweis*
Zahl	Züchtungsdauer (Tage)		Zahl	Züchtungsdauer (Tage)	
1.	7	1:10	7.	6	1:10
2.	11	1:10	8.	7	1:1
3.	5	1:10	9.	6	1:1
4.	5	1:10	10.	6	1:10
5.	10	1:1	11.	10	1:10
6.	6	1:10			

* Verdünnung der Kulturflüssigkeit, bei welcher eben noch Virus nachgewiesen werden konnte.

Poliovirus Typ 3 konnte demnach in den Zellexplantaten eines Kaltblüters (*Lacerta viridis*) während 11 aufeinanderfolgender Passagen, d. h. einer Gesamtzüchtungszeit von 79 Tagen, konstant, wenn auch nur in sehr niedrigem Titer, nachgewiesen werden. Cytopathische Veränderungen des Gewebes konnten in keiner Passage beobachtet werden. In Explantaten der 6. und 9. Passage, die mit einer minimalen Virusdosis (unverdünnte Kulturflüssigkeit) infiziert worden waren, wurde die Virusvermehrung zeitlich, d. h. in täglichen Intervallen, verfolgt. Hierbei gelang der erste Virusnachweis (1:1) am 3. Tag, vom 4. bis 9. Tag betrug die Virustiter 1:10, um schließlich am 10. Tag wieder auf 1:1 abzufallen. Das Kulturvirus der 10. Passage wurde im Neutralisationstest in HeLa-Zellkulturen eindeutig als Poliovirus Typ 3 identifiziert.

Die Annahme, daß sich Poliovirus im verwendeten Kaltblütergewebe tatsächlich, wenn auch in bescheidenem Grade, vermehrt, erscheint durch den während 11 Passagen regelmäßig gelungenen Virusnachweis hinreichend gesichert. Eine rein mechanische Verschleppung des Ausgangsvirus vom Titer 10⁴ ID₅₀ hätte sich — rechnungsgemäß — bereits in der vierten Kulturpassage erschöpfen müssen.

Zusammenfassung

Poliovirus Typ 3 konnte in Leberzellexplantaten eines Kaltblüters (*Lacerta viridis*) während 11 Passagen bzw. 79 Tagen gezüchtet werden. Die nachgewiesenen Infektiositätstiter waren durchwegs niedrig, und cytopathische Veränderungen des Gewebes wurden nicht beobachtet.

Summary

Poliovirus 3 could be cultivated in liver cell explants of a cold blooded animal (*Lacerta viridis*) during 11 passages, i. e. during 79 days. The demonstrable infectivity titres were generally low and cytopathic changes of the cells have not been seen.

Literatur

1. *Schindarow, L.*, und *E. Tonew*: Die Züchtung des Virus abortus der Schafe in Gewebekulturen eines Kaltblüters (*L. viridis*) (im Druck, 1965).
2. *Schindarov, L.*, and *E. Tonew*: Cultivation of the Vaccinia Virus in Tissue Culture of Liver from a Cold-Blooded Animal (*L. viridis*) (im Druck, 1965).

Anschrift des Verfassers: Prof. *L. Schindarow*, Ärztefortbildungsinstitut Ul. „Belo more“ 8, Sofia, Bulgarien.