

## WIELKOŚĆ, BUDOWA, STRUKTURA, CYKL ROZWOJOWY I PÓŹNE STADIA WIRUSÓW OSPY PTAKÓW

ANTON MAYR

Związkowy Instytut Badawczy Chorób Wirusowych Zwierząt w Tübingen

Wirusy ospy ptaków występujące jako 4 typy, tj. wirusy ospy kur, gołębi, kanarków i indyków, są typowymi przedstawicielami grupy wirusów ospy (*Poxvirus group*). Pod względem wielkości, budowy morfologicznej, struktury antygenowej, funkcji i cyklu rozwojowego są one zbliżone do innych wirusów ospy. Nad wirusami ospy ptaków można bez trudu przeprowadzać doświadczenia w laboratoriach, w związku z czym stały się one, łącznie z wirusem krowianki, ulubionym modelem do studiów nad wirusami ospy.

Podobnie jak wszystkie wirusy ospy również wirusy ospy ptaków należą do największych do tej pory poznanych. Są one nawet trochę większe aniżeli wirusy podgrupy variola-vaccinia-ektromelia. W oparciu o badania wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego wymiary wirusów ospy ptaków są następujące: oś długa maksymalnie 390 m, minimalnie 220 m $\mu$ ; oś krótka — maksymalnie 240 m $\mu$ , minimalnie 100 m $\mu$  (Herzberg i Kleinschmidt, 1959). Wymiary te dotyczą tzw. dojrzałych kompleksowych ciałek elementarnych. Ponieważ zmienne położenie ciałek elementarnych w preparacie utrudnia podanie dokładnych danych, liczby powyższe należy uważać za wartości przybliżone.

Wirusy ospy ptaków posiadają budowę kompleksową i są pod względem strukturalnym, jak i czynnościowym wysoce zorganizowane. Wszystkie zawierają kwas dezoksyrybonukleinowy jako integralną część składową ciała elementarnego. Ich budowa chemiczna zbliżona jest do budowy innych wirusów ospy. Jedynie zawartość składników lipidowych jest w nich większa aniżeli w wirusach ospy ssaków.

Na modelu wirusa ospy kanarków Herzberg i Kleinschmidt przeprowadzili studia nad strukturalną budową wirusów ospy ptaków. Ciało elementarne jest wydłużonym owalnym tworem o jednej osi długiej i dwóch różnej długości osiach krótszych, które decydują o jego

spłaszczonej, ale nie cegiełkowatej postaci. Podstawowe składniki morfologiczne stanowią jedna osłonka i jedno ciało wewnętrzne.

Osłonka jest niejednakowej grubości. Przy oglądaniu jej osi długiej ciała elementarnego okazuje się, że jest ona grubsza w dwóch naprzeciw siebie leżących fałdach. Jest rzeczą możliwą, że fałdy te należałoby uważać za twory strukturalnie odrębne od osłonki. Sama osłonka składa się z dwóch błon ściśle do siebie przylegających. Leżące pośrodku ciało wewnętrzne jest wyraźnie odgraniczone od osłonki przez warstwę pośrednią. Ciało to w przecięciu podłużnym wygląda jak laseczka pusta w środku, o zaokrąglonych brzegach. W przekroju poprzecznym zbliżone jest ono wyglądem do klepsydry, jest zatem stosunkowo zwarte i krótkie. Szczegóły strukturalne są dobrze widoczne na modelu ciała elementarnego ospy królików, jak to wynika z badań Herzberga i Kleinschmidta. Cząsteczki wirusa utrwalone zwykłym sposobem na foliach przedmiotowych, a następnie napyłone, posiadają kształt podobny do cegiełki. W cienkich skrawkach ciała elementarnego mają zazwyczaj raczej kształt owalny. Herzberg stoi na stanowisku, że postać cegiełkowata występująca w wirusach ospy ptaków jest artefaktem spowodowanym przez suszenie i inne zabiegi i że raczej owalny kształt cząsteczek wirusa, leżących w komórce, odpowiada ich postaci naturalnej.

Posługując się techniką negatywnego barwienia otrzymano ostatnio nowe dane dotyczące budowy wirusów ospy ptaków. W izolowanych dojrzałych ciałkach elementarnych można było dzięki temu stwierdzić obecność uszeregowanych podjednostek pałeczkowatych, które rozrzucone są na całej powierzchni obrazu pojedynczych cząsteczek.

Jest szczególnie interesujące, że wg Herzberga i Kleinschmidta można stwierdzić pomiędzy wirusami *Vaccinia* i ospy kanarków tylko nieznaczne różnice. Pałeczkowate podjednostki występują początkowo u obydwóch wirusów jako twory wypełnione wzdłuż osi długiej kwasem fosforowo-wolframowym, użytym do kontrastowania. Wewnętrzna średnica, czyli światło tych tworów wynosi ok. 25Å. Średnica zewnętrzna wykazuje u obydwóch wirusów pewne różnice: dla wirusa ospy kanarków wynosi ona np. 90Å, a dla wirusa *Vaccinia* tylko 80Å. Prócz tego u wirusa *Vaccinia* pałeczki z pewną regularnością wystają poza warstwę brzezną. Zjawiska tego nie obserwuje się u wirusa ospy kanarków. Warstwa brzeźna ma wygląd gładki i jest kwestią dyskusji, czy jest to uzależnione od tego, że wirusy ospy ptaków zawierają więcej lipidów niż inne wirusy. Może uszeregowane brzeźnie lipidy „zlepiają” na wzór kitu poszczególne podjednostki, warunkując w ten sposób większą gładkość warstwy brzeźnej.

Również i te wyniki uzupełniają w sposób istotny dane stwierdzające, że ciała elementarne wirusa ospy kanarków są większe aniżeli wirusa

*Vaccinia*. Przy kontrastowaniu utrwalonych ciałek elementarnych kwasem fosforowo-wolframowym różnica wynosi ok. 25% pomiarów linearnych.

Cykl namnażania wirusów ospy ptaków odpowiada cyklowi wirusów ospy ssaków, przebiega jednak znacznie wolniej. Synteza wirusa odbywa się zatem nie poprzez jądro komórki gospodarza, lecz poprzez nowo utworzone, własne ośrodki syntezy, które leżą w protoplazmie komórki. Bodźcem do syntezy jest niemal zawsze tzw. cząsteczka — inicjator, która od zewnątrz przedostaje się do komórki.

Cząsteczka wirusa przedostaje się zatem przy zakażeniu jako całość do komórki. Wkrótce po przejściu przez błonę komórkową znajduje się w cytoplazmie komórki jeszcze nienaruszone cząsteczki wirusa, które do niej przeniknęły i które początkowo są zamknięte w pęcherzyku. Nieco później są już widoczne ciała elementarne, których osłonka częściowo została zniszczona. Podobnie jak u wirusa *Vaccinia* znikają po zakażeniu cząsteczki, które wtargnęły do komórki, a na ich miejsce powstają w cytoplazmie ograniczone ogniska gęstej, ciągliwej substancji. Te ogniska nowo pojawiające się w protoplazmie komórki stanowią ośrodki wytwarzania, czyli syntezy wirusa. Określa się je mianem matrix albo wiroplazma. Ogniska wiroplazmy składają się z drobnoziarnistego materiału, który daje się ze względów strukturalnych łatwo odróżnić od otaczającej je protoplazmy komórki. W przestrzeniach wiroplazmy pojawiają się wkrótce próżne osłonki, które wielkością odpowiadają mniej więcej późniejszym ciałkom elementarnym. Te formy owalne są z kolei ograniczone dwoma ściśle do siebie przylegającymi błonami. Materiał zawarty wewnątrz postaci owalnych posiada taką samą strukturę jak ten, którym cechuje się otaczająca je warstwa wiroplazmy. Wśród tych wczesnych postaci rozwojowych znajduje się również niekompletne postaci owalne, których niezamknięte osłonki półkolisto otaczają wiroplazmę. Prócz tzw. próżnych postaci owalnych pojawiają się w miarę upływu czasu w warstwie wiroplazmy coraz to liczniej postaci owalne z zawartym w nich nukleoidem. Nukleoid przedstawia się jako mały, kolisty twór ciemny o średnicy ok. 80  $\mu$  leżący często odśrodkowo. Niekiedy otacza go pole jaśniejsze.

Od opisanych tu postaci można jeszcze odróżnić postaci owalne, w których ciało wewnętrzne jest wyraźnie szersze, dłuższe, nie tak ostro ograniczone i mniej kontrastowo wyróżniające się.

Na końcu tego stopniowego cyklu rozwojowego tworzą się cząsteczki, które odpowiadają dojrzałym ciałkom elementarnym wirusa i które stwierdza się zarówno wewnątrz komórki, jak też w przestrzeniach pozakomórkowych. Są to wydłużone, owalne cząsteczki, z wyróżnionym ciałkiem wewnętrznym, otoczonym kilkoma błonami.

Rozróżnia się dwie postacie ciałek: 1) ciała elementarne dojrzałe, które przecięte wzdłuż osi podłużnej przedstawiają się jako twory owalnie wydłużone; osłonka zbudowana z dwóch błon otacza wydłużone ciało wewnętrzne zaokrąglone na obydwóch końcach, przypominające kształtem hantle, 2) ciała elementarne dojrzałe przecięte w jednej z osi poprzecznych. Ta postać ma kształt bardziej zaokrąglony, ciało wewnętrzne jest wyraźnie krótsze niż u form poprzednio opisanych i przypomina w obrysach klepsydrę. Dojrzałe ciała elementarne nagromadzone są gęsto obok siebie w pierwszym rzędzie w obszarach protoplazmy odpowiadających warstwom wiropłazmy. Częściowo znajduje się je również tuż pod błoną komórkową, a zatem na obwodzie komórki.

Pomiędzy opisanymi formami rozwojowymi, aż do stadium dojrzałego ciała elementarnego włącznie, obserwuje się liczne postacie przejściowe. Byłoby bardzo ważne ustalenie, od której postaci poczynając cząsteczki nabierają właściwości zakaźnych lub jakie biologiczne i serologiczne czynności można przypisać poszczególnym postaciom rozwojowym. Nie mniejsze znaczenie posiada sprawa stosunku poszczególnych postaci rozwojowych do toksyny wirusa.

W przebiegu zakażenia komórki tworzą się w jej protoplazmie ciała wtrętowe, które można uwidocznić w mikroskopie świetlnym. Struktura tych tworów, które jeszcze obecnie odgrywają poważną rolę w diagnostyce zakażeń ospowych, w dużej mierze została zbadana w oparciu o mikroskop elektronowy. Z wszystkich dotychczas w tym kierunku przeprowadzonych badań wynika, że zarówno warstwy wiropłazmy z wczesnymi postaciami rozwojowymi, jak i nagromadzenia dojrzałych cząsteczek wirusa i stadia późniejsze w mikroskopie optycznym wyglądają jako ciała wtrętowe.

Obok cyklu rozwojowego cząsteczek wirusa w czasie zakażenia komórki nie mniej ciekawe są późne stadia systemu wirus-komórka. Na modelu zakażenia błony owodniowo-omoczniowej zarodka kury wirusem ospy gołębi można było wykazać, że dojrzałe, złożone ciała elementarne wirusa wędrują w kierunku obwodu komórki, usadawiając się ściśle na wewnętrznej stronie błony. W tym stadium stwierdza się często liczne ciała elementarne leżące jedno za drugim, uszeregowane łańcuszkowo wzdłuż ściany komórki. Prócz tego, w przestrzeni odpowiadającej obszarom protoplazmy, w której nagromadzona jest wiropłazma, przychodzi do ogniskowego skupienia dojrzałych cząsteczek wirusa. Te skupienia ciałek elementarnych różnią się przeważnie dobrze od otoczenia (ciała wtrętowe). W środkowych okolicach tych skupień występują wkrótce przejawy zwyrodnienia i rozplynnienia ciałek elementarnych.

Zarysy poszczególnych cząsteczek wirusa zacierają się stopniowo coraz bardziej. Osłonka zewnętrzna „rozpływa się”, przypominające klepsydrę ciało wewnętrzne przejaśnia się, wydłuża, w wyniku czego powstaje

owalna, jednolita przestrzeń pusta. Produktem końcowym tych przemian są twory ziarniste, częściowo nitkowate, przypominające kształtem pałeczkę.

Centralne ogniska rozplynniania stają się coraz to większe. Częstokroć już tylko na ich obwodzie stwierdza się pełne cząsteczki wirusa otaczające pierścieniowato ognisko rozplynnienia. Obecnie badania zmierzają w kierunku przeanalizowania tych produktów rozpadu wirusa, określenia ich znaczenia zarówno dla patogenezy, jak i dla procesu zdrowienia.

Zasługują tu na podkreślenie prace Skalińskiego, dotyczące wpływu odporności gospodarza na morfologię wirusa ospy kur. W stadiach późnych w ogniskach pierwotnego uszkodzenia występują cząsteczki wirusa o kształcie rozetkowym lub ziarniste, które częściowo nie wykazują obecności błony zewnętrznej. W uszkodzeniach późniejszych można stwierdzić obecność pęcherzykowatych, morfologicznie niepełnych cząsteczek wirusa. Skaliński przypisuje powstanie tych postaci wpływom odporności gospodarza. W oparciu o nasze badania przeprowadzone na błonach omocznio-owodniowych, zakażonych wirusem ospy ptaków, doszliśmy do wniosku, że zaobserwowane przejawy rozpuszczenia ciałek elementarnych nie mogą zależeć od „prawdziwych” mechanizmów odpornościowych, albowiem zarodek kury nie jest jeszcze w stanie wytwarzać odporności aktywnej. Przypuszczalnie wchodzi w grę inne reakcje obronne komórki.

A. Ма и р (Тюбинген)

## ВЕЛИЧИНА, СТРОЕНИЕ, СТРУКТУРА, ЦИКЛ РАЗВИТИЯ И ПОЗДНИЕ СТАДИИ ВИРУСОВ ОСПЫ ПТИЦ

### Резюме

Вирусы оспы птиц немного больше вирусом подгруппы *variola* — *vaccinia* — *ektromelia*. Размеры приведены на основе работы Герцберга и Клейншмидта (1959). Вирусы оспы птиц имеют комплексное строение. От вирусом оспы млекопитающих они отличаются большим содержанием липидов. На основе исследований вируса оспы канареек (Герцберг и Клейншмидт), приведены данные, касающиеся строения элементарных телец, а в частности оболочки и внутреннего тельца. Оболочка состоит из двух плотно примыкающих друг к другу оболочек. Внутреннее тельце отделено от оболочки промежуточным слоем. Структурные различия были исследованы на модели элементарных телец оспы кроликов. Путем применения техники негативной окраски можно было глубже вникнуть в строение зрелых элементарных телец.

Герцбергом и Клейншмидтом были установлены незначительные различия между вирусом *vaccinia* и вирусом оспы канареек. Палочкообразные подъединицы, как правило, выходят за периферийную зону только у вируса *vaccinia*.

Процесс цикла развития вирусов оспы птиц более медленный, чем вирусов оспы млекопитающих. Синтез вируса происходит в собственных новообразованных центрах, расположенных в плазме клетки. Синтез начинается, так наз. тельце-инициатор, которое извне проникает в клетку. Особенно много внимания посвящено очередным формам развития вируса в вироплазме, образованию пустых оболочек величины позднейших элементарных телец, неполным овальным формам, овальным формам с нуклеоидом, зрелым элементарным тельцам. Обсуждается вопрос значения исследований по инфекционности частиц вируса в зависимости от стадии развития.

Как зоны вироплазмы с ранними формами развития, так и накопление зрелых частиц вируса и поздние стадии импонируют как инклюзивные тельца при исследованиях в оптическом микроскопе.

Представлены собственные исследования, касающиеся так наз. поздних стадий системы вирус — клетка. На модели аллантаидно-амниотических оболочек, зараженных вирусом оспы птиц, доказано, что зрелые комплексные элементарные тельца вируса передвигаются на периферию клетки и укладываются вдоль клеточной стенки. В пределах зоны вироплазмы происходит скопление частиц вируса (инклюзивные тельца). В этих скоплениях наблюдаются симптомы дегенерации и расплавления. Симптомы расплавления элементарных телец, по мнению автора, не зависят от подлинных иммунизационных процессов, как это предполагается Скалинским.

Anton Mayr

## SIZE, STRUCTURE, DEVELOPMENTAL CYCLE AND LATE STAGES OF POX-VIRUS AVIUM STRAINS

### Summary

*Pox-virus avium* strains are somewhat larger than those from *variola-vaccinia-ectromelia* subgroup. Their dimensions are given after Herzberg and Kleinschmidt (1959). These viruses possess a complex structure. They differ from viruses of mammal pox group in a greater content of lipids. Data concerning the structure of elementary body, in particular capsid and core, are given according to the studies of canary pox

virus (Herzberg and Kleinschmidt). Capsid consists of two tightly adjacent to each other membranes. An intermediate layer lies between capsid and corn. Structural differences were studied on the model of elementary bodies of rabbit pox. Better understanding of the structure of mature elementary bodies was due to the application of negative staining technique.

Herzberg and Kleinschmidt have found only slight differences between *vaccinia* and canary pox viruses. Rod-like subunits protrude as a rule above the marginal zone only in *vaccinia virus*. Developmental cycle of *Pox-virus avium* strains is slower than that of viruses of mammals' pox. Synthesis of virus occurs in newly formed centers situated in cell plasma. It is initiated by so-called initiator particle which penetrated into cell from without. Particularly great attention was paid to the consecutive developmental forms of the virus in *matrix viroplasma*, emergence of empty capsids of the size of later elementary bodies, not fully developed oval forms, oval forms with nucleoid, and mature elementary bodies. The importance of studies on the infectivity of virus particles as dependent on their developmental stage is discussed.

Both viroplasma zones with early developmental forms and aggregates of mature virus particles and late stages are imposing as inclusion bodies when studied under optical microscope.

The author's own investigations referring to so-called late stages of virus cell system have been presented. It was demonstrated on the model of CAM infected with *Pox-virus avium* that mature complex elementary bodies of the virus move toward the periphery of the cell and arrange along the cell wall. Within the viroplasma zone virus particles (inclusion bodies) aggregate. Symptoms of degeneration and dissolution are observed in these aggregates. The dissolution symptoms of elementary bodies are not, according to the opinion of the author, dependent on true immunity processes, as Skaliński has suggested.