

## CERCETĂRI REFERITOARE LA INACTIVAREA TERMICĂ A VIRUSULUI COXSACKIE

V. Blazsek

Până astăzi nu s-a reuşit să se extragă din virusul Coxsackie acizi ribonucleici infecţioşi (ARN), decît prin procedeul cu fenol. (1, 2, 6, 11, 12). În cursul cercetărilor noastre anterioare nu am izbutit să obţinem produse infecţioase prin dezagregarea termică a virusului (3). Am presupus că în urma tratării termice, învelişul proteinic al virusului se denaturează în așa fel, încît „încapsulează” în el ARN infecţios, oprind implicit declanşarea procesului de infectare.

În lucrarea de faţă aducem noi contribuţii în ceea ce priveşte stabilitatea termică a ARN infecţios, încercînd în acelaşi timp să elucidăm şi rolul „încapsularii” acidului în cursul dezagregării termice a virusului.

### *Descrierea procedurii utilizat*

În experienţele noastre am utilizat virus Coxsackie de tip A<sub>10</sub>. Am omogenizat musculatura scheletică a unor şoareci paralizaţi, cu o soluţie de NaCl 0,14 M (pH 7,2), avînd un volum de 5 ori mai mare decît musculatura; omogenizatul a fost apoi centrifugat timp de 30 de minute, la 3600 x g. Supernatantul transparent a fost dializat timp de 24 ore cu o soluţie NaCl 0,14 M. Dializatul a fost centrifugat timp de 30 de minute, la 4° C, la 22.000 x g. Extractul cu conţinut viral (în cele ce urmează: virusul) a fost conservat în stare congelată. Înainte de efectuarea experienţelor, virusul a fost diluat în proporţie de 1:1 cu o soluţie tampon utilizată curent în aceste experienţe. ARN infecţios a fost preparat, folosind procedeul cu fenol descris într-o comunicare anterioară (2), cu o soluţie de tampon fosfat (0,06 M fosfat, 1 M NaCl, pH 7,4), dintr-un virus diluat în proporţie de 1:1. Toate preparatele de ARN au fost tratate cu ribonuclează pancreatică (15 µg/ml, timp de 15 minute la 22° C), pentru punerea în evidenţă a particulelor virale native. Tratarea termică a virusului şi a ARN a fost efectuată în baie de apă cu o precizie de ±0,2° C. Virusul diluat cu o soluţie tampon corespunzătoare a fost ţinut 5 minute la temperatura de experienţă şi apoi răcit cu apă la gheaţă. Infectiozitatea virusului şi a ARN a fost stabilită pe şoareci mai tineri de 24 de ore. Titrul virusului s-a calculat după metoda Reed şi Muench (4).

### *Experienţe şi rezultate*

*Extragerea ARN cu fenol la temperaturi mai înalte.* În vederea determinării stabilităţii termice a ARN din virusul Coxsackie, am cercetat dacă utilizînd procedeul extragerii cu fenol timp de 5 minute la temperatura de 50°, 61°, 85° şi 98° se poate obţine ARN infecţios. ARN extras la temperaturi mai ridicate s-a dovedit a fi întotdeauna infecţios. În comparaţie cu infecţiozitatea ARN obţinut la 22° C, activitatea extractului la 98° C a scăzut numai la o cincime. Dacă reprezentăm persistenţa proporţională a ARN în funcţie de temperatură, obţinem o curbă de inactivare pe care o dăm în figura nr. 1. Sub efectul ribonucleazei pancreatice, toate preparatele de ARN şi-au pierdut infecţiozitatea, ceea ce înseamnă că virusul nativ nu a fost prezent în nici unul din ele.

*Dezagregarea termică a virusului.* Dacă virusul a fost ţinut timp de 5 minute la 61° C într-un mediu cu o lărie ionică mică (0,03 M fosfat, 0,14 M NaCl, pH 7,4) sau într-un mediu cu o lărie ionică mare (0,03 M fosfat, 1 M NaCl, pH 7,2), produsul a continuat să-şi păstreze infecţiozitatea. În schimb titrul virusului a scăzut la 1/10.000 din valoarea iniţială. Activitatea restantă în cursul tratării nu se datorează ARN, deoarece infecţiozitatea lui nu a fost suprimată sub efectul ribonucleazei pancreatice. (V. tabelul nr. 1.) Ridicarea temperaturii la 85° C şi la 98° C a atras după sine pierderea

completă a activității. Nici prin scurtarea timpului de încălzire la 1 minut nu s-a putut obține ARN infecțios.

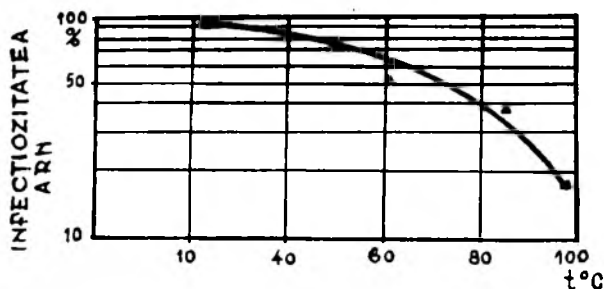


Fig. nr. 1.

*Examinarea persistenței ARN.* Pentru dovedirea „încapsulării” ARN viral în învelișul proteic denaturat, am încercat, dar nu am reușit să obținem cu fenol la 22° C un produs activ din virusul tratat în prealabil la 85° și 98° C, care după cum am văzut a fost inactivat în cursul acestei tratări. Dacă după tratarea termică nu am îndepărtat precipitatul proteic denaturat (la 20.000 x g), atunci din virusul tratat la 85° C nu am reușit să obținem nici cu fenol decît un ARN cu o activitate foarte redusă, iar din virusul tratat la 98° C extractul nu a putut fi obținut de loc (tabelul nr. 1). ARN infecțios nu s-a obținut nici după repetarea tratării cu fenol.

#### Discuții

Datele relatate în lucrarea de față arată, în concordanță cu constatările făcute în cursul cercetărilor noastre anterioare, că diminuarea considerabilă a infectiozității ce survine după extragerea cu fenol nu este cauzată de efectul dăunător al acestei substanțe. Faptul acesta pare sigur, dacă curba de inactivare termică a ARN Cocksackie, obținută în prezența fenolului, este comparată cu curba de inactivare termică a ARN extras, fie din Cocksackie, fie din alt virus, obținută în lipsa fenolului (1, 6, 10). Traiectoria curbei din fig. nr. 1 se aseamănă foarte mult cu traiectoria curbelor descrise în literatură. În cursul extragerii cu fenol, ridicarea temperaturii poate să favorizeze dezagregarea particulelor virale, denaturarea învelișului proteic, dizolvarea proteinelor în stratul fenolic, mărind cu alte cuvinte eficacitatea deproteinizării. Faptul acesta a fost dovedit și de experiențele efectuate la 50°C cu virusul de encefalită equină. (6). Rezultatele obținute în urma extragerii cu fenol la temperaturi mai ridicate (tabelul nr. 1.), pun în lumină rolul foarte important pe care îl are ARN viral în procesul de infecție, dat fiind că nu se poate concepe o proteină care să rămână nativă la 98°C în prezența fenolului.

La o temperatură mai ridicată (61°C), activitatea virusului nativ scade repede, pentru că odată cu creșterea ei, (la 85° și 98°) să dispară complet. Rezultatele experiențelor noastre arată că la 61°C învelișul proteic al unei părți din corpusculii virali rămîne neatins. La temperaturi mai ridicate, particulele virale se descompun, transformîndu-se în înveliș proteic denaturat și în ARN infecțios. Acest fenomen a putut fi dovedit pînă acum la 2 virusuri vegetale (7, 8).

Ca urmare a stabilității termice a ARN Cocksackie, și din acest virus se poate extrage prin dezagregare termică ARN, fapt ce rezultă din experiențele relatate în cele de mai sus. Datele cuprinse în tabelul nr 1 arată însă că apariția ARN infecțios nu a putut fi observată în ciuda faptului că ARN viral își păstrează infectiozitatea și la 98°C în prezența fenolului. De asemenea s-a dovedit și faptul

Tabelul nr. 1.

Experiență	Timpul de încălzire în minute	Titrul $++ \pm$ ( $-10g_{10} ID_{50}$ )		
		61°C	85°C	95°C
0,3 M fosfat + 0,14 M NaCl	1	—	0	0
Idem	5	3,0	0	0
Idem, apoi extragere cu fenol la 22° C	5	—	0	0
0,03 M fosfat + 1 M NaCl	1	—	0,3	0
Idem	5	4,6	0	0
Idem, apoi extragere cu fenol la 22° C	5	—	0+	0+
			0,2 $^{++}$	0 $^{++}$
Titrul de virus netratat	—	—	0,3	

+ = supernatant obținut la 20.000 x g.

++ = fără centrifugare.

+++ = calcul obținut cel puțin prin 3 experiențe paralele.

că nu „încapsularea“ ARN a împiedicat apariția lui, așa cum unii autori au dovedit în cazul anumitor virusuri inactivate la temperaturi mai scăzute (5,9), deoarece nici cu fenol nu s-a reușit să se extragă ARN activ din virus inactivat (v. tabelul nr. 1.). Acest fapt dovedește inactivarea completă a ARN pe care o cauzează nu temperatura, ci alți factori. Noi credem că ribonucleaza prezentă în extractul viral nepurificat a suprimat infecțiozitatea ARN, pus în libertate în cursul dezagregării termice (ARN fiind sensibil la ribonuclează). O astfel de presupunere pare cu atât mai verosimilă, cu cât, după cum se știe, ribonucleazele de origine animală își păstrează activitatea chiar și la 100°C (13). Dezagregarea termică completă este dovedită de faptul că peste 61° C infecțiozitatea virusului încetează brusc, în ciuda observației că activitatea ARN la 85°C în prezența fenolului (care inhibează activitatea ribonucleazei) a fost 40% din cea inițială. Prin urmare prin dezagregarea termică a virusului Cocksackie se poate obține ARN infecțios, numai dacă ribonucleaza este îndepărtată sau inactivată.

Din experiențele noastre mai rezultă și faptul că inactivarea termică a virusului Cocksackie se efectuează în două faze: în prima fază se denaturează învelișul proteic, mai sensibil la căldură, iar după aceea se inactivează ARN. Această corelație se poate bine observa și din forma curbei de inactivare termică, obținută la virusul poliomielit. (10). Unei porțiuni a curbei de inactivare termică îi aparține o energie de activare de  $\Delta H = 26.600$  cal/mol, iar celeilalte porțiuni  $\Delta H = 202.000$  cal/mol. Mărirea celor două  $\Delta H$  concordă cu valorile  $\Delta H$  caracteristice pentru ARN și proteine. Din cele expuse mai sus rezultă acum în mod clar că la înregistrarea curbelor de inactivare (pe baza principiului lui Arrhenius) putem să obținem valori  $\Delta H$  reale, care aparțin componentelor virale numai dacă am eliminat efectul dăunător al ribonucleazei. În prezența fermentului, viteza inactivării termice este cu mult mai mare, iar componenta ce aparține ARN dispare.

Din constatările noastre mai rezultă și faptul că la preparatele virale nepurificate, inactivarea completă se poate realiza la temperaturi mai scăzute și într-un timp mai scurt, dacă stimulăm dezagregarea particulelor și punerea în libertate a ARN sensibil la ribonucleaza din învelișul proteinic. În adevăr, acest proces este real, deoarece am constatat că un preparat viral Cocksackie avînd un titru de  $10^{10}$  ID<sub>50</sub> în prezența unui detergent de 0,1% își pierde complet infecțiozitatea deja la 61°C în 5 minute. În absența detergentului, infecțiozitatea nu se pierde așa cum rezultă din datele cuprinse în tabelul nr. 1.

Atît datele referitoare la prezența directă a ribonucleazei cît și cele în legătură cu inhibarea ei și cu experiențele efectuate cu virusul Cocksackie purificat, constituie obiectul unei alte comunicări.

*Sosit la redacție: 19 octombrie 1962.*

#### *Bibliografie*

1. HOLLAND J. J., MCLAREN, L. C., HOYER B. H., SYVERTON J. T.: J. Exp. Med. (1960), 112, 841;
2. BLAZSEK V.: Rev. Med. (1961), 7, 39;
3. BLAZSEK V.: în curs de apariție;
4. CAJAL N.: Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane, Ed. Acad. București (1958);
5. BACHRACH H. L.: Biochem. biophys. res. Com. (1959), 6, 356;
6. TOVARNIČKI V. I., TIHONENKO T. I.: Uspehi Sovr. Biol. (1960), 49, 2;
7. KARPER J. A., STEERE R. L.: Virology (1961), 7, 127;
8. LIPINCOTT J. A.: Virology (1961), 13, 348;
9. ADA G. L., ANDERSON S. G.: Nature (1959), 183, 799;
10. FRENCH R. C., ARMSTRONG R. E.: Can. J. Microbiol. (1960), 6, 175;
11. PORTOCALA R.: Studii și cerc. în iram. (1960), 11, 597;
12. SPIRIN A. S.: Uspehi sov. biol., (1960), 49, 261;
13. CEPINOĞA O. P.: Acizii nucleici și rolul lor biologic, Ed. Medicală, București (1958);