

УДК 636:616.98:578.824.11:616-036.22

DOI: 10.31073/vet_biotech44-09

ПОЛУПАН І.М., канд. вет. наук, e-mail: vetmedic@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

РУДОЙ О.В., канд. вет. наук, e-mail: rudspass@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ВИДІЛЕННЯ ВІРУСУ СКАЗУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

В статті представлені результати дослідження придатності різних перещеплюваних ліній культур клітин для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу.

Дослідження показали, що, з використанням стандартизованої методики, в культурі клітин ВНК-21 С13 вдалось ізолювати вірус сказу у восьми з 11-и патологічних матеріалів (72,7%). Також низьку чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлено в культурі клітин нирки сайги (НС), в якій було виділено лише два з 11 (18,2%) вуличних ізолятів вірусу сказу. Культура клітин N2a (ATCC CCL-131) показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100% (виділено 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах та ЗТ-ПЛР.

Ключові слова: сказ, лабораторна діагностика, патологічний матеріал, культура клітин, біологічна проба, ізоляція вірусу.

Вступ. В системі контролю сказу серед тварин провідне місце займає своєчасна якісна та експресна лабораторна діагностика. Сказ – це головний зооноз, для якого стандартизовані методи діагностики, а також усі заходи з контролю сказу знаходяться під егідою ВООЗ і МЕБ. В Україні основним методом діагностики сказу є реакція прямої імунофлуоресценції (РПФ), а у випадку отримання сумнівних результатів, проводиться постановка біологічної проби на білих мишах. Не дивлячись на те, що біологічна проба є високочутливим методом діагностики сказу, він володіє суттєвими недоліками: потрібна велика кількість тварин та спеціальні умови їхнього утримання, тривалий період проведення тесту – 30 днів (відповідно ДСТУ 7053:2009 «Методи діагностики сказу»), що обумовлює пізню відповідь про наявність або відсутність захворювання [1].

Альтернативою біопробі для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу є використання різних перещеплюваних ліній клітин, використання яких дозволяє протягом 24–72 годин ізолювати вірус сказу з патологічного матеріалу. Така ситуація вимагає розробки та впровадження в лабораторну

практику методики виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу із застосуванням системи *in vitro* [2, 3].

Для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу використовуються різні лінії клітин: нирка сирійського хом'яка (ВНК-21 С13 – АТСС ССL-10), фібросаркома собаки (А-72), нейробластома миші (Neuro-2a – ССL-131), невринома гассерова вузла щура (НГУК-1), нирка сайги, НЕК-293 та ін. [4–6].

Використання клітин дозволяє протягом трьох днів ізолювати вуличні ізоляти вірусу сказу при високому рівні кореляції результатів з біопробою на мишах. Крім цього, використання культури клітин є більш економічним порівняно з біологічною пробою. Так, дослідниками з Бразилії було встановлено, що витрати на дослідження 400 зразків патологічного матеріалу методом вірусовиділення в культурі клітин становлять 82 910 доларів США, а витрати на аналогічний об'єм досліджень методом біологічної проби – 179 429 доларів США [7].

Враховуючи вищезгадане, метою роботи було здійснення оцінки придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу.

Матеріали і методи досліджень. Для проведення досліджень з визначення придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу було уніфіковано протокол постановки реакції, який передбачав декілька етапів підготовки зразку, вирощування клітин, внесення дослідних зразків, заміни середовища, інкубування, фарбування та оцінки результатів.

Підготовка зразку. Для підготовки суспензії для інфікування культури клітин необхідно приготувати 20% суспензію з шматочків амоніакового рогу, кори півкуль, мозочка, довгастого мозку на фосфатно-сольовому буферному розчині PBS 0,1 М, рН 7,4.

Вирощування клітин. Клітини, які використовуються для вірусовиділення, трипсинізуються з моношару, який вже сформований (клітини знаходяться в експоненціальній фазі їх кінетичного росту – 2–3 добовий моношар). В клітинній суспензії не повинно бути клітинних агрегатів для чого проводиться піпетування клітинної суспензії. Клітини збирають в об'ємі 20–30 см³ середовища з додаванням 5% інактивованої фетальної сироватки крові ВРХ (FBS).

Внесення дослідних зразків. 100 мкл освітленого гомогенату мозку додають до 200 мкл 2×10^5 клітин/см³ суспензії клітин (щойно пересіяної 2–3 добової лінії клітин) у чотири лунки 96-лункової мікропанелі.

Заміна середовища. Після 24-годинної інкубації за температури 37°C та 5% CO₂ видаляють супернатант з кожної лунки за допомогою аспіраційної системи та додають у дозі 200 мкл середовища DMEM з вмістом 5% FBS.

Інкубування. Інкубування за температури 37°C та 5% CO₂ продовжується після заміни середовища з подальшим інкубуванням 72 години. Після чого супернатант видаляється за допомогою аспіраційної системи або у разі необхідності подальших досліджень, або здійснення сліпого пасажування, видаляється піпеткою і зберігається за температури мінус 80°C.

Фарбування. Після завершення інкубування лунки з клітинами промивали фосфатно-сольовим буферним розчином, рН 7,2–7,4. Потім клітини фіксували 80% ацетоном (охолодженим до температури мінус 20°C) впродовж 30 хвилин, висушували на повітрі протягом 60 хвилин і фарбували за температури 37°C протягом 30 хвилин моноклональними кон'югованими ФІТЦ антитілами в робочому розведенні згідно інструкції виробника. Видаляли флуоресціюючий кон'югат і споліскували два рази фосфатно-буферним розчином, а його залишки видаляли витрушуванням плашки по фільтрувальному паперу.

Результат. Для виявлення специфічного світіння вірусу сказу в культурі клітин використовували люмінесцентний мікроскоп. Під люмінесцентним мікроскопом за збільшенні $\times 100$ оглядали усю поверхню кожної лунки. Облік реакції якісний (за наявності специфічної флуоресценції хоча б одній лунці – реакція позитивна).

Для проведення порівняльних досліджень з виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу використано три лінії культур клітин ВНК–21 С13 (АТСС ССL-10), N2a (Neuro-2a) (АТСС ССL-131) та НС (нирка сайги). В якості тест-об'єктів використано 11 зразків патологічного матеріалу (головного мозку): 3 від котів, 4 від собак, 2 від лисиць і 2 від великої рогатої худоби.

Перевірку інфекційності патологічного матеріалу проводили постановкою біологічної проби на білих мишах [8]. Наявність генетичного матеріалу вірусу сказу в патологічному матеріалі визначали в ЗТ-ПЛР [9].

Результати досліджень та їх обговорення. В культурі клітин ВНК-21 С13 з 11-и патологічних матеріалів виділено вірус сказу у восьми, що становило 72,7%. Низька чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлена у культури клітин НС, в якій було виділено лише два з 11 (18,2%) вуличних ізолятів вірусу сказу. Клітини Neuro-2a показали абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100% (виділено 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах і ЗТ-ПЛР (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняння чутливості різних систем *in vitro* та *in vivo* для виділення вуличних ізолятів вірусу сказу

№ п/п	Ізолят	Культура клітин			Біологічна проба	ЗТ-ПЛР
		ВНК-21 С13	N2a	НС		
1	09C66	+	+	-	+	+
2	09C92	+	+	-	+	+
3	09D121	+	+	+	+	+
4	09F94	-	+	-	+	+
5	09D84	-	+	-	+	+
6	09F108	+	+	-	+	+
7	08C39	+	+	-	+	+
8	09D71	-	+	-	+	+
9	09D58	+	+	-	+	+
10	09CO111	+	+	-	+	+
11	09CO103	+	+	+	+	+

Примітки: + – позитивний результат; - – негативний результат.

Усі матеріали, що використовувалися в дослідженнях, були позитивними на сказ із підтвердженням інфекційності шляхом постановки біологічної проби на мишах, а також постановкою зворотно-транскриптазної полімеразно-ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) з використанням специфічних діагностичних олігонуклеотидних праймерів: JW6DPL, JW12, N165, JW10P.

Отже, дослідженнями встановлено, що культура клітин нейробластоми миші N2a (ATCC CCL-131) є найбільш придатною системою *in vitro* для проведення виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу.

Таким чином запропонований метод виділення вірусу сказу в культурі клітин N2a забезпечує швидке (протягом трьох діб) виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу та володіє чутливістю на рівні біологічної проби на білих мишах. Однак, при впровадженні в практику методу вірусовиділення з використанням культури клітин Neuro-2a (ATCC CCL-131), необхідно враховувати придатність для дослідження тільки свіжого патологічного матеріалу, що забезпечить достовірність отриманих результатів.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В культурі клітин ВНК-21 С13 виділено вісім з 11-и матеріалів (72,7%). Низька чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлена у культурі клітин НС, в якій було виділено лише два з 11 (18,2%) вуличних ізолятів вірусу сказу. Культура клітин Neuro-2a показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100%

(виділено 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах та ЗТ-ПЛР.

За результатами досліджень встановлено, що оптимальною культурою клітин для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу є нейробластома миші Neuro-2a (ATCC CCL-131).

За результатами проведених досліджень з оцінки чутливості і придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу розроблені методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу» (затверджені Вченою радою ІВМ НААН протокол № 9 від 02.11.2023) та отримано патент України на корисну модель «Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу» (№ 153299 від 14.06.2023).

ISOLATION OF RABIES VIRUS IN CELL CULTURE / Polupan I.M., Rudoi O.V.

Introduction. *The main method of diagnosing rabies is the Direct Fluorescent Antibody test (DFA). In case of doubtful results, the mouse inoculation test is performed. Despite the fact that the mouse inoculation test is a highly sensitive method of rabies diagnostic, it has significant limitations. An alternative to the mouse inoculation test for the isolation of the rabies virus from pathological material is the use of cell culture.*

The goal of the work. *To evaluate the suitability of various cell cultures for isolation of the rabies virus.*

Materials and methods of research. *To conduct comparative studies on the isolation of rabies virus from pathological material, three types of cell cultures BHK-21 C13 (ATCC CCL-10), Neuro-2a (ATCC CCL-131) and SK (saiga kidney) were used. 11 samples of the pathological material (brain) were used: 3 from cats, 4 from dogs, 2 from foxes and 2 from cattle. The infectivity of the pathological material was tested by performing the mouse inoculation test. The presence of the genetic material of the rabies virus in the pathological material was tested by RT-PCR.*

Results of research and discussion. *In the cell culture BHK-21 C13, the rabies virus was isolated in eight of 11 pathological materials, which made 72.7%. Low sensitivity to street isolates of the rabies virus was determined in the cells SK, in which only two out of 11 (18.2%) street isolates of the rabies virus were isolated. Cell culture Neuro-2a showed an absolute sensitivity of 100% (11 out of 11 materials were isolated) compared to the results of the mouse inoculation test and RT-PCR.*

Conclusions and prospects for further research. *According to the results of the research, it was determined that the optimal cell culture for isolating the rabies virus from pathological material is a cells of mouse neuroblastoma Neuro-2a (ATCC CCL-131).*

Keywords: *rabies, laboratory diagnosis, pathological material, cell culture, mouse inoculation test, virus isolation.*

REFERENCES

1. *Veterynarna medytsyna. Metody diahnostryky skazu [Veterinary medicine. Methods of diagnosis of rabies]: DSTU 7053:2009. (2009). Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy [in Ukrainian].*

2. Webster, W.A. (1987). A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 51(3), 367-369.
3. Barrat, J., Barrat, M. J., Picard, M., & Aubert, M.F. (1988). Diagnostic de la rage sur culture cellulaire. Comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation a la souris [Diagnosis of rabies by cell culture]. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 11(3-4), 207-214. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(88\)90039-2](https://doi.org/10.1016/0147-9571(88)90039-2).
4. Madhusudana, S.N., Sundaramoorthy, S., & Ullas, P.T. (2010). Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14(12), e1067-e1071. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.07.004>.
5. Zimmer, K., Wiegand, D., Manz, D., Frost, J.W., Reinacher, M., & Frese, K. (1990). Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 37(5), 392-400. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1990.tb01074.x>.
6. Ivanov, M.Yu. (2011). Epizootologichna ta molekulyarno-biologichna kharakterystyka vulychnykh izolyativ virusu skazu v Ukraini [Epizootological and molecular-biological characteristics of street isolates of the rabies virus in Ukraine]. *Candidate's thesis*. Kyiv [in Ukrainian].
7. Corona, T.F., Böger, B., Rocha, T.C.D., Svoboda, W.K., & Gomes, E.C. (2018). Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(1), 39-43. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0303-2017>.
8. Dorward, W.J. (1974). Laboratory Techniques in Rabies – Third Edition. *The Canadian Veterinary Journal*, 15(9), xix.
9. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). (2024). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf.