

ПОРІВНЯЛЬНА ЧУТЛИВІСТЬ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ДО ЕНТЕРОВІРУСІВ ВИДІЛЕНИХ ІЗ СТИЧНИХ ВОД

Понятовський В.А., Широбоков В.П., Бобир В.В.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Ключові слова: ентеровіруси, культура клітин

Вступ

Незважаючи на бурхливий розвиток сучасних молекулярно-генетичних методів, виділення вірусів на культурі клітин все ще залишається надійним та ефективним засобом діагностики та індикації вірусних інфекцій. Результативність цього методично складного та тривалого методу в значній мірі залежить від вибору лінії культури клітин, яка буде використовуватися при виділенні та ідентифікації вірусних інфекційних агентів.

На сьогоднішній день визнано, що ні одна клітинна культура не підходить для індикації всіх кишкових вірусів, та зокрема ентеровірусів, які можуть бути присутні у пробах стічної води [2]. Найчастіше для виділення та ідентифікації ентеровірусів застосовують перещеплювані лінії клітин людини та мавп, які володіють специфічними рецепторами ліпопротеїдної природи, та на яких адсорбуються дані віруси. Число таких ліній клітин, що використовуються в сучасній лабораторній практиці, постійно збільшується, а тому виникає необхідність проведення порівняння їх чутливості до певних вірусних агентів.

Різні вірусологічні лабораторії та дослідники протягом останніх десятиліть інтенсивно проводять пошук найбільш оптимальних клітинних культур для роботи з ентеровірусами. Так, Tasnee Chonmaitreel et al. для ізоляції ентеровірусів вивчали 4 типи культур клітин (BGM, HEK, MRC-5, МК). Автори встановили, що найбільш перспективними виявилися MRC-5, в яких розмножувалися ЕЧО віруси та поліовіруси. В клітинах BGM добре та швидко розмножувалися віруси групи Коксакі. Дослідниками було показано, що при використанні двох ліній культур результативність дослідження збільшувалася на 11 % [5].

Nathalie J. Schmidt et al. досліджували проби стічної води з використанням різних ліній культур клітин (RD, HFDK, RhMK, MFK). Було показано, що поліовіруси найчастіше ізолювалися на клітинах RD, віруси Коксакі А на культурах RD та HFDK, Коксакі В виділялися на BGM, ЕЧО віруси на RD та RhMK. Автори також довели, що перещеплювані клітини MFK є альтернативою первинно-трипсинізованам RhMK [2].

Sheryl L. G. Johnston та Charles S. Siegel вивчали можливість використання клітин RD, HEp-2 та RМК для диференціації ентеровірусів, не застосовуючи реакцію віруснейтралізації. Автори показали, що використовуючи різні типи культур клітин, можна провести первинну диферен-

ціацію на основі характеристики ЦПД та розділити віруси на групи [4].

Lic. Luis Sarmiento Perez et al. після масової вакцинації проти поліомієліту в республіці Куба обстежили 1515 зразків стільця здорових дітей з використанням клітин L20В. Незважаючи на високу селективність цієї клітинної лінії, в них також розмножувалися та давали ЦПД віруси групи Коксакі А (4, 8, 10) [1].

Patricia M. Davis та R. J. Phillpotts показали, що на клітинах Vero досить добре культивуються віруси Коксакі В, менш задовільні результати були отримані по відношенню до ЕЧО вірусів. Дані клітини можна використовувати також для ізоляції поліовірусів. На клітинах Vero ідентифікація ентеровірусів в реакції нейтралізації проходила успішно [3].

Для виділення ентеровірусів та зокрема поліовірусу з об'єктів зовнішнього середовища ВООЗ рекомендує використовувати дві лінії культур клітин – RD та L20В [8].

Метою роботи був вибір найбільш оптимальної комбінації ліній клітин, що можуть використовуватися для вірусологічного моніторингу стічних вод.

Матеріали та методи:

Для проведення даного дослідження нами були обрані наступні типи перещеплюваних клітин:

- RD (клітини рабдоміосаркоми людини) – чутливі до поліовірусів, вірусів ЕЧО та деяких штамів Коксакі А (за виключенням А1, А19, А22), ентеровірусів 68-101;
- HEp-2 (клітини карциноми гортані людини) – добре розмножуються поліовіруси та віруси Коксакі В;
- Vero (клітини нирки африканської мавпи) – активно розмножуються віруси поліомієліту, Коксакі В та більшість серотипів вірусів ЕЧО;
- HeLa (карцинома шийки матки людини) – віруси Коксакі В, поліовірус, віруси ЕЧО;
- L20В (лінія мишачих клітин, яким генно-інженерним шляхом надана властивість експресувати рецептори до поліовірусу). Дані клітини високочутливі до поліовірусу, хоча деякі непіліомієлітні ентеровіруси також здатні в них розмножуватися (Коксакі А 4, 8, 10).

Клітини вирощувалися в пластикових матрацах із ростовою площею 25 та 75 см². В якості середовища для культивування використовувалося 199 середовище з додаван-

ням 10 % ембріональної телячої сироватки та антибіотиків (150 од/мл пеніциліну та 100 од/мл стрептоміцину або лінкоміцину). Культивування проводили за загальноприйнятою методикою [8]. Оцінка цитопатогенної дії здійснювалася за системою 4+ під інвертованим мікроскопом, порівнюючи з контролем клітин.

Концентрування ентеровірусів із проб міської стічної води проводили за допомогою природного глинистого матеріалу бентоніту, який переведений в дрібнодисперсну гелеву форму [7].

Геном ентеровірусів виділяли із бентонітових концентратів шляхом поєднання двох методик – гуанідинтіоціанат-хлороформ-фенольної екстракції та методу сорбції РНК на частинках силікагелю за Boom et al. [6]. З цією метою використовували комерційні набори “Рибо Сорб” та “Рибо Золь С” (“Ампли Сенс”, РФ) згідно інструкції виробника. Реакцію зворотної транскрипції проводили одразу після виділення РНК, у зв’язку з поганою стійкістю останньої в очищеній формі. ДНК, комплементарну вірусній РНК, одержували за допомогою ферменту ревертази (М-MLV – зворотна транскриптаза) з набору “Реверта-L-100” (“Ампли Сенс”, РФ) згідно інструкції виробника. Реакція проходила при 37°C 30 хвилин в термостаті Perkin Elmer (США).

Ампліфікацію вірусної кДНК проводили на багатоканальному ампліфікаторі з активним регулюванням “Gene Amp PCR System 2400” (США) за звичайною методикою. В реакції використовували реагенти “Ампли Сенс® Enterovirus-EPh”.

Наявність та якість ПЛР-продуктів аналізували методом гель-електрофорезу, який проводили у 1,5% агарозному гелі в однократному трис-ацетатному буфері рН 8,5 (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЕДТА), що містив 0,5 мкг/мл етидія броміду.

Результати та обговорення:

Для вибору оптимальної комбінації перещеплюваних ліній культур клітин дослідження проводили у декілька етапів. Спочатку з використанням ЗТ-ПЛР було досліджено 63 проб стічної води, 31 проба виявилася позитивною щодо наявності ентеровірусної РНК. Далі позитивні зразки паралельно досліджували на п’яти лініях культур клітин. Для визначення чутливості клітинних ліній до ентеровірусів застосовували традиційний метод зараження клітин вірусом, використовуючи однодобовий моношар клітин (з посівною концентрацією $1,5 \cdot 10^5$ клітин/мл), що були вирощені в пеніцилінових флакончиках. Контакт вірусмісного матеріалу із клітинами проходив при 37°C протягом 30 хвилин, після чого додавали поживне середовище для підтримання репродукції вірусу (сере-

довище 199 з додаванням телячої ембріональної сироватки до 2%). Щоденно перевіряли моношари культур клітин на появу ЦПД, використовуючи мікроскоп із зворотнім ходом світлових променів (інвертований мікроскоп). При появі характерних для ентеровірусів ознак (округлі світлі клітини, що відділяються від поверхні скла), реєстрували зміни та продовжували спостереження до 100 % деструкції моношару клітин. При відсутності змін культури спостерігали ще не менше 14 днів. Порівнювали цитодеструктивну активність вірусів на різних типах клітин. Чутливість культури клітин до ентеровірусів із проб стічної води оцінювали за вираженістю ЦПД через різні проміжки часу при інфікуванні моношарів бентонітовими концентратами. Ступінь деструкції моношарів клітин виражали у відсотках. Результати дослідження наведені в таблиці 1.

Експериментальні дослідження дали змогу встановити, що із 31 зразку, що дали позитивний результат на наявність ентеровірусної РНК, в 20 випадках виділялися вірусні інфекційні агенти. Всього було ізольовано 14 штамів ентеровірусів, в томі числі Коксаки В 5 – 5 штамів, Коксаки В 1 – 1 штаб, Коксаки В 4 – 1 штаб, ЕСНО 3 – 3 штами, ЕСНО 5 – 1 штаб, ЕСНО 11 – 1 штаб, поліовіруси – 2 штами, 6 штамів не нейтралізувалися набором використаних діагностичних сироваток, та були віднесені до групи не типованих ентеровірусів.

Усі п’ять типів культур клітин дали позитивні результати при дослідженні проб, що містили поліовіруси. Найчутливішими в даному випадку виявилися клітини L20B (табл. 2). Вже через 36 годин після інфікування наступала 100 % ступінь деструкції клітинного моношару. Порівняльний ряд чутливості клітинних культур до штамових ізолятів поліовірусу із проб стічної води розміщується в такому порядку – L20B > HEp-2 > RD > HeLa > Vero.

Віруси Коксаки В в основному виділялися на клітинах HEp-2, ЕСНО віруси на клітинах RD та частково на HEp-2 та HeLa. Також на клітинах RD вдалося виділити значну кількість ЦПА (4 штами), які не типувалися в реакції віруснейтралізації із використанням діагностичних ентеровірусних сироваток.

Інтенсивність розвитку та проявів ЦПД залежало від культури клітин та типу ентеровірусів (рис. 1). Найінтенсивніше цитодеструкція проявлялася на клітинах HEp-2. Вже через 24 годин після інфікування моношару позитивними зразками з’являлися характерні ознаки репродукції ентеровірусів (ЦПД супроводжувалась подвійним світлоломленням цитоплазми клітин, появою зернистості з подальшою круглоклітинною дегенерацією моношару).

Таблиця 1.

Виділення ентеровірусів із проб стічної води на різних перещеплюваних культурах клітин

Культура клітин	Кількість позитивних проб	% від загальної кількості проб	Серотипи ентеровірусів, що виділялися
HEp-2	13	41,94 %	Коксаки В, ЕСНО, поліовіруси
RD	11	35,48 %	ЕСНО, поліовіруси, не типовані віруси
Vero	7	22,58 %	ЕСНО, поліовіруси
HeLa	9	29,03 %	Коксаки В, ЕСНО
L20B	4	12,9 %	Поліовіруси, не типовані віруси

Чутливість різних культур клітин до поліовірусів, виділених із проб стічної води

Клітина культура	Ступінь деструкції клітинного моношару					
	12 год.	24 год.	36 год.	48 год.	60 год.	72 год.
Vero	–	–	25 %	50 %	75 %	100 %
HEp-2	–	50 %	90 %	100 %	–	–
L20B	20 %	70 %	100 %	–	–	–
RD	–	40 %	75 %	100 %	–	–
Hela	–	25 %	50 %	75 %	100 %	–

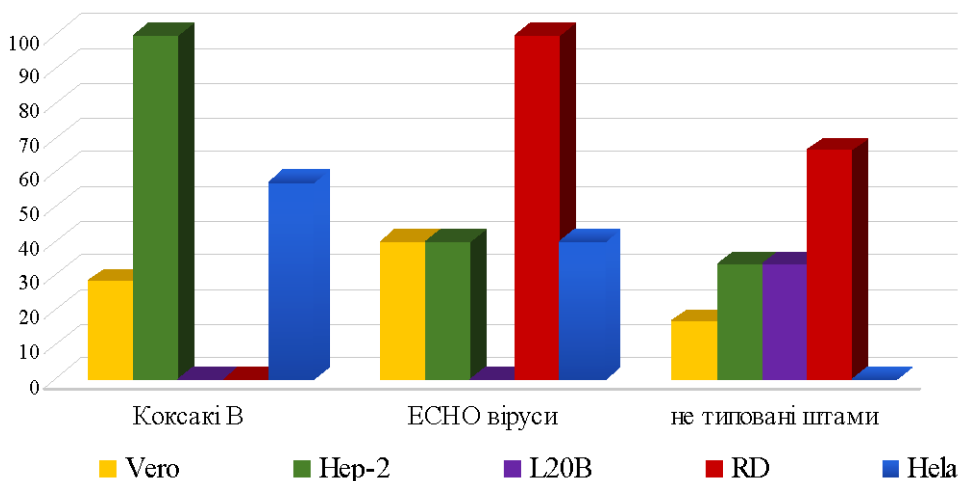


Рис. 1. Узагальнені дані щодо порівняльної чутливості клітинних культур до штамів ЕCHO, Коксакі В та не типованих вірусів, виділених із проб стічної води.

Висновки:

Опираючись на вище викладений матеріал можна зробити наступні висновки:

1. Чутливість кожної культури клітин до різних типів ентеровірусів виділених із стічної води не однакова, а тому бажано використовувати декілька культур у комплексі.
2. Оптимальною комбінацією для проведення моніторингу стічної води з приводу ентеровірусного забруднення виявилось використання культур клітин HEp-2 та RD. Їх можна рекомендувати для швидкого виділення та ідентифікації ентеровірусів із об'єктів зовнішнього середовища.
3. Із п'яти досліджуваних ліній культур клітин Vero та L20B були найменш чутливими при індикації ентеровірусів у пробах стічної води.
4. Для виявлення поліовірусів у пробах з об'єктів зовнішнього середовища найкраще зарекомендували себе клітини L20B, на другому місці – HEp-2 та RD.

Рецензент: д.мед.н., професор С.Т. Омельчук

ЛІТЕРАТУРА

1. Lic. Luis Sarmiento Perez. Evidence for nonpoliovirus enterovirus multiplication in L20B cells / Lic. Luis Sarmiento Perez, Dr. Pedro Mos Lago, Tec. Rosa Palomera Puentes, Lic. Luis Morier Diaz, Lic. Magile Fonseca Quintana y Dra. Sonia Resik Aguirre / REV CUBANA MED TROP. – 2007. – Vol. 59(2). – p. 98-101.

2. Nathalie J. Schmidt. Comparative Sensitivity of Various Cell Culture Systems for Isolation of Viruses from

Wastewater and Fecal Samples / Nathalie J. Schmidt, Helen H. Ho, John L. Riggs, and Edwin H. Lennette / Applied and Environmental Microbiology. – 1978. – Vol. 36. – No. 3. – p. 480-486.

3. Patricia M. Davis Davis. Susceptibility of the VERO line of African green monkey kidney cells to human enteroviruses / Patricia M. Davis and R. J. Phillpotts / J. Hyg., Camb. – 1974. – Vol. 72. – p. 23-30

4. Sheryl L. G. Johnston. Presumptive Identification of Enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK Cell Lines / Sheryl L. G. Johnston and Charles S. Siegel / Journal of clinical microbiology. – 1990. – Vol. 28. – No. 5. – p. 1049-1050.

5. Tasnee Chonmaitreel. Comparison of Cell Cultures for Rapid Isolation of Enteroviruses / Tasnee Chonmaitreel, Craig Ford, Candace Sanders and Helen L. Lucia / Journal of clinical microbiology. – 1988. – Vol. 26. – No. 12. – p. 2576-2580.

6. Лаврова Д.В. Использование метода полимеразной цепной реакции в системе санитарно-вирусологического контроля загрязнения воды различных водных объектов энтеровирусами: Диссертация на соискателя кандидата медицинских наук. – Москва, 2005 – с. 131.

7. Применение бентонита для выявления энтеровирусов у человека и во внешней среде // Методические рекомендации. – Киев, 1986 г. – с. 24.

8. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е издание. – ВОЗ. – Женева. – 2005.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК
К ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ СТОЧНЫХ ВОД
ЭНТЕРОВИРУСАМ**

*Понятовский В.А., Широбоков В.П., Бобырь В.В.
Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина*

Резюме. В работе приведены данные сравнения чувствительности перевиваемых культур клеток к энтеровирусам, которые были выделены из сточных вод. Установлено, что оптимальной комбинацией для проведения мониторинга сточных вод по поводу энтеровирусного загрязнения оказалось использование культур клеток Нер-2 и RD.

Ключевые слова: энтеровирусы, культура клеток.

**COMPARATIVE SENSITIVITY OF CONTINUOUS
CELL CULTURES TO ENTEROVIRUSES
SEPARATED FROM SEWAGE**

*V. Ponyatovski, V. Shyrobokov, V. Bobyr
Bogomolets National Medical University,
Kyiv, Ukraine*

Summary. The paper presents data for comparing the sensitivity of inoculated cell cultures to enteroviruses, which were isolated from wastewater. Found that the optimum combination for monitoring wastewater on enterovirus contamination was the use of cell cultures HEp-2 and RD.

Key words: enteroviruses, cell culture.