

© Бобир В.В., Понятовський В.А., Назарчук О.А., Дюжикова О.М., Широбоков В.П., Долінчук Л.В.

УДК: 578.835.1:57.017.4:57.083.1

**Бобир В.В.<sup>1</sup>, Понятовський В.А.<sup>1</sup>, Назарчук О.А.<sup>2</sup>, Дюжикова О.М.<sup>1</sup>, Широбоков В.П.<sup>1</sup>, Долінчук Л.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна), <sup>2</sup>Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

## ПОРІВНЯЛЬНА ЧУТЛИВІСТЬ КУЛЬТУР КЛІТИН ДО КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ ЕНТЕРОВІРУСІВ

**Резюме.** В статті наведені результати визначення оптимальної комбінації перещеплюваних ліній клітин, які можна використовуватися для виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу. В дослідженнях використовували як прототипні вакцинні штами вірусів поліомієліту 1 типу (штам Lsc2ab) та вірусів Коксакі В6 (штам Hammon), так і клінічні ізоляти ентеровірусів, отримані від осіб з дисбіотичними порушеннями кишківника. Показані результати порівняльного дослідження типів перещеплюваних клітин RD, HEp-2, Vero, HeLa, L20B, L41 (мишачі фібробласти). Встановлено оптимальну комбінацію клітинних культур для проведення моніторингу поширеності ентеровірусних інфекцій в контексті діяльності програми з ерадикації поліомієліту: культури клітин L20B - для виділення поліовірусів та HEp-2 - для виділення поліовірусів та інших видів ентеровірусів. Зафіксовано затримку розвитку цитопатичної дії у культурі клітин при їх інфікуванні вірусними клінічними ізолятами у порівнянні з прототипними штамми вірусів. Наведені дані мають важливе практичне значення в діагностиці при виділенні ентеровірусів з матеріалу від хворих та із об'єктів зовнішнього середовища.

**Ключові слова:** ентеровіруси, чутливість, культури клітин.

### Вступ

Сучасні методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій, в тому числі й спричинених ентеровірусами, як правило, ґрунтуються на виявленні самого збудника, нуклеїнової кислоти, вірусних антигенів або проведенні серологічної діагностики. Серед найбільш доступних, нами обрано вірусологічний метод, який передбачає виділення інфекційних агентів з подальшою ідентифікацією. Не зважаючи на бурхливий розвиток сучасних молекулярно-генетичних методів, вірусологічний метод все ще залишається надійним та ефективним способом діагностики та індикації вірусних інфекцій. Його вагомою перевагою є те, що на відміну від інших методів, даний спосіб дозволяє не лише визначити наявність вірусів в матеріалі, а й вивчити їх біологічні властивості, зокрема провести їх внутрішньотипову диференціацію, визначити вірулентність, імуногенні властивості тощо.

Найчастіше для виділення та ідентифікації ентеровірусів застосовують перещеплювані лінії культур клітин людини та деяких тварин, що наділені специфічними рецепторами ліпопротеїдної природи, на яких адсорбуються дані віруси. У зв'язку з тим, що кількість таких ліній клітин, які використовуються в сучасній лабораторній практиці, постійно збільшується, виникає необхідність проведення дослідження їх чутливості до певних кишкових вірусних агентів.

Разом з тим, 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. Дослідники з різних країн світу протягом тривалого часу вивчали чутливість різних типів культур клітин. На сьогоднішній день визнано, що ні одна клітинна культура не є універсальною для індикації всіх кишкових вірусів, зокрема ентеровірусів.

Так, вітчизняними вченими, що порівняльно вивчали чутливість перещеплювальних культур клітин (HEp-2, RD, Vero), було зафіксовано найбільшу чутливість клітин лінії RD до вірусів ECHO. Крім того, показано, що інфекційна активність штамів, виділених від хворих, виявилася більшою у порівнянні зі штамми, виділеними від здорових осіб [1, 2]. На думку інших дослідників, які для ізоляції ентеровірусів використовували 4 типи культур клітин (BGM, HEK, MRC-5, MK), найбільш перспективними є культура клітин MRC-5, в яких найкраще розмножувалися ECHO віруси та поліовіруси. Ними також було показано, що при використанні двох ліній культур результативність дослідження збільшувалася на 11 % [8]. Інші науковці найчастіше ізолювали поліовіруси на клітинах RD, віруси Коксакі А на культурах RD та HFDK, Коксакі В виділяли на BGM, ECHO віруси на RD та RhMK. Авторами показано, що чутливість перещеплюваних клітин MFC є не меншою ніж у первинно-трипсинізованих RhMK [5]. Цікавими є роботи Sheryl L. G. Johnston та Charles S. Siegel, які вивчали можливість використання клітин RD, HEp-2 для диференціації ентеровірусів, не застосовуючи реакцію віруснейтралізації. Дослідниками показано можливість проведення первинної диференціації ентеровірусів на основі аналізу їх ЦПД культурі клітин та розділення вірусних агентів на групи, використовуючи різні типи культур клітин [7]. Останніми роками все більше дослідників схиляється до вибору клітин L20B (лінія мишачих клітин, яким генно-інженерним шляхом надана властивість експресувати рецептори до поліовірусу), особливо важливим це є в період ерадикації поліомієліту. Окрім того, не зважаючи на високу вибірковість чутливості цієї клітинної лінії, зафіксовано можливість репродукції в них вірусів групи Коксакі А (4, 8, 10) [6]. Разом з тим, для виділення ентерові-

русів, зокрема поліовірусів, з клінічного матеріалу ВООЗ рекомендує використовувати дві лінії культур клітин - RD та L20B [3].

Метою роботи був вибір найбільш оптимальної комбінації ліній клітин, що можуть використовуватися для виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу, зокрема, з фекальних мас осіб, в анамнезі яких спостерігались порушення складу нормальної мікрофлори кишківника.

### Матеріали та методи

Клінічним матеріалом слугували фекальні маси. Їх відбирали у стерильні скляні флакончики. Далі переводили у суспензію за допомогою розчину Хенкса або фосфатно-сольового розчину у співвідношенні 10 мл на 1 грам матеріалу. Пробірку інтенсивно струшували до гомогенізації зразку та центрифугували при 3000 об./хв. протягом 30 хв. за температури 4°C. Надосадову рідину деконтамінували за допомогою антибіотиків (2000 ОД пеніциліну та стрептоміцину на 1 мл) або хлороформу (0,5 мл на 10 мл досліджуваної рідини).

Віруси: клінічні ізоляти ентеровірусів (віруси поліомієліту та віруси Коксаки А і В, отримані від осіб з дисбіотичними порушеннями кишківника). Лабораторні вакцинні штами вірусів поліомієліту I типу (Lsc2ab), музейні прототипні штами вірусів Коксаки В-6 (штам Hammon), одержані з Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН.

В процесі експериментів порівняльно вивчено наступні типи перещеплюваних клітин: RD (клітини рабдоміосаркоми людини); HEp-2 (клітини карциноми гортані людини); Vero (клітини нирки африканської мавпи); HeLa (карцинома шийки матки людини); L20B (лінія мишачих клітин, яким генно-інженерним шляхом надана властивість експресувати рецептори до поліовірусу); L41 (мишачі фібробласти).

Культивування культур клітин проводили за загальноприйнятною методикою [3]. Оцінка цитопатогенної дії здійснювалася за системою 4+ під інвертованим мікроскопом, порівнюючи з контролем клітин.

РНК виділяли шляхом її сорбції на частинках силікагелю за Boom et al. [4]. Ампліфікацію вірусної кДНК проводили на багатоканальному ампліфікаторі з активним регулюванням "GeneAmp PCR System 2400" (США) у відповідності до інструкції виробника. 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 та 0,002 М ЕДТА), що містив 0,5 мкг/мл етидія броміду.

Методика постановки реакції віруснейтралізації принципово не відрізнялась від загальноприйнятої [3]. У роботі були використані моно- та полівалентні сироватки виробництва Інституту поліомієліту і вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН.

### Результати. Обговорення

З метою визначення оптимальної комбінації перещеплюваних ліній культур клітин дослідження проводили у декілька етапів. На першому етапі, шляхом використання ЗТ-ПЛР було досліджено 78 зразків фекалій, які проявляли різну цитопатичну дію у будь-якій з нижче представлених культур клітин. В результаті 51 зразок виявився позитивним щодо наявності ентеровірусної РНК. Далі позитивні зразки паралельно досліджували на шести лініях культур клітин.

Для визначення чутливості різних клітинних ліній до ентеровірусів застосовували традиційний метод зараження клітин вірусом, використовуючи однодобовий моношар клітин, 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 (середовище 199 з додаванням телячої ембріональної сироватки до 2%). Щоденно перевіряли моношари культур клітин на появу ЦПД, використовуючи 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 не менше 10 днів. Порівнювали цитодеструктивну активність вірусів на різних типах клітин. Чутливість культури клітин до ентеровірусів оцінювали за вираженістю ЦПД через різні проміжки часу при інфікуванні моношарів досліджуваними зразками. Ступінь деструкції моношарів клітин виражали у відсотках (табл. 1).

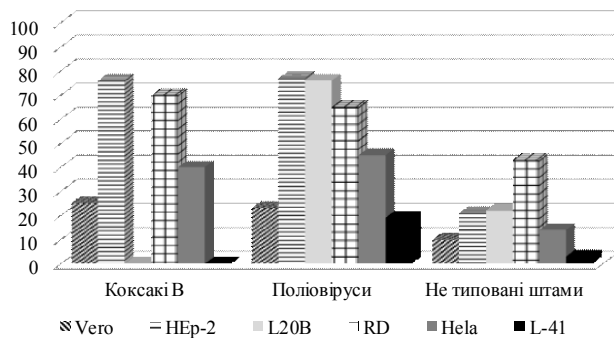
У результаті експериментів було встановлено, що із 51 зразку, у якому методом полімеразної ланцюгової реакції було зафіксовано присутність ентеровірусної РНК, в 35 випадках вдалось виділити вірусні інфекційні агенти. Зокрема, поліовіруси - 28 штамів, з них 1 типу - 23 штами, 2 типу - 9 штамів, 3 типу - 5 штамів; віруси Коксаки В - 5 штамів (Коксаки В6 - 3 штами та по одному

**Таблиця 1.** Ефективність виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу на різних лініях перещеплюваних культур клітин.

| Культура клітин | Кількість позитивних зразків | % від загальної кількості зразків | Вид ентеровірусів, що виділялись                         |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| HEp-2           | 32                           | 62,74%                            | Поліовіруси 1-3 типу, не типовані віруси, Коксаки В3, В6 |
| RD              | 21                           | 41,18%                            | Поліовіруси 1 типу                                       |
| Vero            | 18                           | 35,3%                             | Поліовіруси 1 та 3 типу, Коксаки В3                      |
| L20B            | 17                           | 33,3%                             | Поліовіруси 1-3 типу, не типовані віруси                 |
| Hela            | 23                           | 45,0%                             | Поліовіруси 1 та 3 типу, Коксаки В2, В6                  |
| L-41            | 5                            | 9,8%                              | Поліовіруси 2 типу, не типовані віруси                   |

**Таблиця 2.** Швидкість розвитку деструкції клітинного моношару при інфікуванні клінічними ізолятами поліовірусів.

| Культура клітин | 12 год | 24 год | 36 год | 48 год  |
|-----------------|--------|--------|--------|---|
| RD              | -      | 75%    | 90%    | Повна деструкція у всіх лініях культур клітин |
| Vero            | -      | 75%    | 90%    |   |
| L20B            | 25%    | 50%    | 75%    |   |
| Hela            | -      | 50%    | 100%   |   |
| HEp-2           | -      | 90%    | 100%   |   |
| L-41            | -      | 50%    | 75%    |   |



**Рис. 1.** Узагальнені дані щодо порівняльної чутливості клітинних культур до штамів ентеровірусів.

**Таблиця 3.** Порівняльна чутливість різних типів культур клітин до клінічних ізолятів та лабораторних штамів ентеровірусів.

| Культури клітин | Віруси                                    |         |                     |         |   |         |                                    |         |
|-----------------|---|---------|---------------------|---------|---|---------|------------------------------------|---------|
|                 | Коксакі В6 (лабораторний штам)            |         | Коксакі В6 (ізолят) |         | Вірус поліомієліту 1 типу (лабораторний штам) |         | Вірус поліомієліту 1 типу (ізолят) |         |
|                 | Ступінь деструкції клітинного моношару, % |         |                     |         |   |         |                                    |         |
|                 | 12 год.                                   | 24 год. | 12 год.             | 24 год. | 12 год.                                       | 24 год. | 12 год.                            | 24 год. |
| RD              | 25%                                       | 75%     | 0%                  | 50%     | 25%   | 90%     | 0%                                 | 75%     |
| Vero            | 0%  | 75%     | 0%                  | 60%     | 25%   | 90%     | 0%                                 | 75%     |
| L20B            | 0%  | 0%      | 0%                  | 0%      | 25%   | 50%     | 25%                                | 50%     |
| Hela            | 25%                                       | 80%     | 0%                  | 50%     | 0%  | 50%     | 0%                                 | 50%     |
| HEp-2           | 30%                                       | 90%     | 0%                  | 90%     | 25%   | 100%    | 0%                                 | 90%     |
| L41             | 0%  | 0%      | 0%                  | 0%      | 0%  | 50%     | 0%                                 | 50%     |

штаму вірусів Коксакі В3 та Коксакі В2), 9 штамів не нейтралізувалися жодним з наборів використаних діагностичних сироваток і були віднесені до групи не типованих ентеровірусів.

Як показали проведені дослідження, інтенсивність розвитку та глибина прояву цитопатичної дії залежить як від типу виділених вірусних агентів, так і від типу культур клітин, на яких проводилось виділення.

Усі шість використаних типів культур клітин проявляли високу чутливість при їх інфікуванні матеріалом, що містив віруси поліомієліту. Разом з тим, найбільш чутливим виявились культури клітин L20B та HEp-2 (табл. 2). Вже через 48 годин після інфікування наступала 100

% ступінь деструкції клітинного моношару. Порівняльний ряд чутливості клітинних культур до штамів ізолятів поліовірусу зафіксовано в такому порядку - L20B > HEp-2 > Hela > RD > Vero > L41. Віруси Коксакі В в основному виділялися на клітинах HEp-2, Hela та Vero.

Інтенсивність розвитку та проявів ЦПД залежало від культури клітин та типу ентеровірусів. 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 світлозаломленням цитоплазми клітин, появою зернистості з подальшою круглоклітинною дегенерацією моношару (рис. 1).

Крім того, проведено порівняльний аналіз цитодеструктивної активності клінічних ізолятів вірусів та їх прототипних (музейних) штамів. Виявилось, що при однаковій інфікуючій дозі вірусів Коксакі В6 (6,25- 1g10) та вірусів поліомієліту (6,5- 1g10) прояв цитопатичної дії клінічних ізолятів суттєво поступається такій у тих вірусів, що тривалий час культивувались в лабораторії і є адаптованими до досліджуваних культур клітин (табл. 3).

Так, прояви ЦПД на окремих лініях культур клітин (RD, Hela, HEp-2) реєстрували вже через 12 годин після інокуляції лабораторних штамів вірусів Коксакі В6, натомість, у культурах клітин, інфікованих клінічними ізолятами вірусів Коксакі В6, ознаки цитопатичної дії реєструвалися лише через 24 год. Після інфікування лабораторними штамми вірусів поліомієліту 1 типу (штам Lsc2ab) у таких лініях культур клітин як HEp-2, RD, Vero, L20B розвиток ЦПД спостерігався вже через 12 годин, в той час, як після інфікування клінічними ізолятами початок розвитку ЦПД після 12 годин спостереження було зафіксовано лише на культурах клітин L20B. Крім того, цитодеструктивна активність лабораторних штамів була значно вищою і на деяких культурах клітин через добу сягала 100% деструкції моношару (табл. 3).

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Чутливість кожної культури клітин до різних типів ентеровірусів виділених з клінічного матеріалу є не однаковою, через це раціонально використовувати комбінації декількох клітинних культур.

2. Оптимальною комбінацією для проведення моніторингу поширеності ентеровірусних інфекцій в контексті діяльності програми з ерадикації поліомієліту виявилось використання культур клітин L20B, на яких добре виділяються поліовіруси та HEp-2, що є найбільш чутливими при виділенні інших видів ентеровірусів. Цю комбінацію можна рекомендувати для швидкого виділення та ідентифікації ентеровірусів з фекальних мас. Із досліджуваних ліній культур клітин Vero та L41 були найменш чутливими при виділенні ентеровірусів з клінічного матеріалу.

У більшості досліджуваних культур клітин розвиток

ЦПД при інфікуванні лабораторними штамами вірусів поліомієліту та Коксаки В6 настає швидше, у порівнянні з клінічними ізолятами, що потрібно обов'язково враховувати при вірусологічній діагностиці.

### Список літератури

1. Гриценко Л. М. Порівняльна чутливість перещеплювальних клітинних культур до вірусів ECHO / Л.М. Гриценко // Сучасні аспекти військової медицини. - 2010. - вип. 16. - С. 73-76.
2. Евтушенко А.И. Сравнительная чувствительность клеточных культур к энтеровирусам / Лабораторная диагностика. - 2004. - вып.4. - С. 42-46.
3. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е издание. - ВОЗ. - Женева. - 2005.
4. Boom et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / Journal of clinical microbiology, Mar. 1990, p. 495-503/
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

### **Бобыр В.В., Понятовский В.А., Назарчук А. А., Дюжикова А.Н., Широбоков В.П., Долинчук Л.В.** СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР К КЛИНИЧЕСКИМ ИЗОЛЯТАМ ЭНТЕРОВИРУСОВ

**Резюме.** В статье приведены результаты определения оптимальной комбинации культур клеток, которые могут использоваться для выделения энтеровирусов из клинического материала. В исследованиях использовались как прототипные вакцинные штаммы вирусов полиомиелита 1 типа (штамм Lsc2ab) и вирусов Коксаки В6 (штамм Hammon), так и клинические изоляты энтеровирусов, полученные от лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника. Показаны результаты сравнительного изучения типов перевиваемых клеток RD, HEp-2, Vero, HeLa, L20B, L41 (мышинные фибробласты). Определена оптимальная комбинация клеточных культур для проведения мониторинга распространенности энтеровирусных инфекций в контексте деятельности программы по эрадикации полиомиелита: культуры клеток L20B - для выделения полиовирусов и HEp-2 - для выделения полиовирусов и других видов энтеровирусов. Зафиксировано задержку развития цитопатического действия в культуре клеток при их инфицировании клиническими изолятами вирусов. Приведенные данные имеют важное практическое значение в диагностике при выделении энтеровирусов из материала от больных и из объектов внешней среды.

**Ключевые слова:** энтеровирусы, чувствительность, культуры клеток.

### **Bobyry V.V., Poniatovskiy V.A., Nazarchuk O.A., Djugikowa E.M., Shyrobokov V.P., Dolinchuk L.V.** COMPARATIVE SENSITIVITY OF CELL CULTURES TO ENTEROVIRUSES CLINICAL ISOLATES

**Summary.** In the research there were presented the results of determination of selection of optimal combinations of different cell cultures which can be used for enteroviruses isolation from clinical material. Prototypical vaccine strains of poliovirus I type (strain Lsc2ab) and Coxsackie viruses B6 (strain Hammon), also clinical isolated enteroviruses obtained from patients with dysbiotic disorders are used in research. There were presented the results of research of such types of cell cultures as RD, HEp-2, Vero, HeLa, L20B, L41 (mouse fibroblasts) are studied with comparison. There was identified the optimal combination of cell cultures for monitoring of enterovirus infections spreading with the context of the polio eradication program: cell culture L20B - for polioviruses detection and HEp-2 - for polio and another enteroviruses specieses detection. The retardation of cell culture cytopathic effect after infection with viral clinical isolate was determined. Obtained results should be considered during enteroviruses isolation from patient material and environment.

**Key words:** enteroviruses, sensitivity, cell cultures.

*Рецензент д.мед.н., проф. Палій Г.К.*

*Стаття надійшла до редакції 13.11.2015 р.*

*Бобир Віталій Васильович* - к.мед.н., доц. кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця; vitalibobyry@ukr.net

*Понятовський Вадим Анатолійович* - асист. кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України, vitalibobyry@ukr.net

*Назарчук Олександр Адамович* - к.мед.н., асистент кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України; nazarchukoa@gmail.com

*Дюжикова Олена Михайлівна* - к.мед.н., доц. кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України, vitalibobyry@ukr.net

*Широбоков Володимир Павлович* - академік НАН та НАМН України, заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України; shirobokov-bent@rambler.ru

*Долинчук Людмила Василівна* - к.біол.н., асистент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця; vitalibobyry@ukr.net