

Przydatność próby izolacji wirusa wścieklizny na komórkach mysiej neuroblastomy w diagnostyce wścieklizny

JOANNA OTACHEL-HAWRANEK

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. gen. K. Pułaskiego 52, 50-900 Wrocław

Otachel-Hawranek J.

Usefulness of the method of rabies virus isolation in the neuroblastoma cell line for the diagnosis of rabies

Summary

In the study, the usefulness of rabies virus isolation in neuroblastoma cell culture (RTCIT) as a new method for the diagnosis of rabies was examined. RTCIT results were compared with those obtained by conventional diagnostic methods (FAT and MIT) in terms of their sensitivity in detecting street strains of rabies virus in the brain tissue of suspected animals. The presence of rabies antigen in the brain tissue of animals was confirmed in 93% samples, using FAT and RTCIT, and in 91.6% samples, using MIT. Two results were MIT positive and RTCIT negative and two other results were MIT negative and RTCIT positive. The samples positive only in RTCIT reacted doubtfully in the FAT direct method. Moreover, none of the seven RFFIT-positive highly diluted (10^{-4} - 10^{-6}) samples of animal brain gave positive reaction in MIT. A thirty-day cycle of observation appeared to be too short for the expression of rabies virus in the infected mice. On the other hand, cytotoxic effect prevented the detection of rabies virus by the RTCIT method in two contaminated samples of brain tissue. The samples were MIT positive. The results of this study indicate that RTCIT was able to detect rabies virus in the brain tissue of rabid animals even when its quantity in the inoculum was very low. Owing to its high sensitivity, RTCIT can replace the mouse inoculation test in routine rabies diagnosis.

Keywords: rabies virus detection, RTCIT, MIT, FAT

Rutynowe postępowanie przy diagnostyce wścieklizny polega na wykonaniu preparatu odciskowego z rogów Ammona, kory mózgowej, mózdzku i rdzenia przedłużonego podejrzanego zwierzęcia i zabarwieniu metodą FAT (fluorescent antibody test). W przypadku uzyskania wątpliwego wyniku FAT zakażone są domózgowo myszy i obserwowane przez 21 dni. Z tkanki mózgowej myszy padłej w wyniku zakażenia wykonywany jest preparat FAT w celu potwierdzenia zakażenia. Przeżycie przez inokulowane myszy okresu inkubacji dowodzi ujemnego wyniku badania (2, 12). Zatem diagnostyka zakażeń wirusem wścieklizny testem inokulacji myszy (MIT – mouse inoculation test) pociąga za sobą długi czas oczekiwania na wynik badania. Zalecanym przez WHO i OIE alternatywnym testem dla próby biologicznej jest izolacja wirusa wścieklizny na komórkach mysiej neuroblastomy (RTCIT – rabies tissue culture infection test), na których RV (rabies virus) ulega ekspresji w ciągu 1-4 dni (2, 24). Jednak z danych piśmiennictwa wynika, że w niektórych przypadkach testem tym nie wykryto obecności wirusa u chorych zwierząt (5, 14, 18, 23).

Celem badań była analiza dynamiki namnażania się szczepu dzikiego (terenowego) RV na komórkach

mysiej neuroblastomy oraz porównanie czułości testu RTCIT z FAT i MIT w zakresie wykrywania obecności RV w tkance mózgowej podejrzanych zwierząt.

Materiał i metody

Badania wykonano na 43 próbkach tkanki mózgowej zwierząt domowych i dzikich dostarczonych z terenu do Zakładu Higieny Weterynaryjnej, u których wcześniej, techniką rutynową (FAT, MIT), rozpoznano wściekliznę. Próbkę tkanki mózgowej pochodziły od 25 lisów, 8 jenotów, 3 kun, 2 kotów, 1 tchórza i 4 krów. Badania wykonano na materiale mrożonym, przechowywanym w temperaturze -20°C lub -70°C przez 1-3 miesiące.

Linie komórek mysiej neuroblastomy C 1300 NA, która jest podklonem linii Neuro2A (ATCC CCL 131), otrzymano z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Hodowle komórek pasażowano przy użyciu trypsyno-wersenu (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław) używając jako płynu wzrostowego Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) z dodatkiem 1% L-glutamin (Gibco), 10% surowicy płodu bydłęcego (Costar), 5% fosforanu tryptozy (Gibco), 1% aminokwasów (Gibco), 4% witamin (Gibco) i 0,4% antybiotyków (0,2 ml penicyliny rozpuszczonej w 6 ml PBS i 0,2 ml streptomycyny rozpuszczonej w 5 ml PBS, Polfa).

Obecność wirusa u badanych zwierząt wykrywano testem bezpośredniej fluorescencji (FAT), próbą biologiczną na 4-tygodniowych myszach (MIT) i poprzez izolację wirusa na linii komórek mysiej neuroblastomy (RTCIT). Badanie techniką FAT i MIT wykonano wg obowiązujących instrukcji (2, 12), a test RTCIT zgodnie z procedurą Bourhy i Sureau (8) w modyfikacji Seroka i wsp. (19).

Próbę biologiczną wykonano na białych myszach pochodzących z hodowli własnej ZHW we Wrocławiu. RTCIT wykonano w probówkach Leightona z lamelkami (Corning-Costar). Preparaty odciskowe z tkanki mózgowej zwierząt i uzyskane po zakażeniu hodowli komórkowej barwiono koniugatem antynukleokapsydowym (Biovetta oraz Diagnostics Pasteur). Wyniki FAT, MIT i RTCIT odczytywano w mikroskopie fluorescencyjnym (Optiphot X2, NIKON).

Z poszczególnych próbek tkanki mózgowej wykonywano preparaty odciskowe na szkiełkach podstawowych i barwiono metodą FAT. Następnie próbkę rozcierano w mózdzierzu i sporządzano 10% zawiesinę w płynie MEM Eagle z 10% dodatkiem surowicy płodu bydłęcego i antybiotyków. Przygotowaną zawiesinę pozostawiano na 1 godzinę w lodówce do odstania lub wirowano przy 2 tys. obr./min. przez 10 minut. Następnie supernatant rozcieńczano dziesięciokrotnie w płynie MEM uzyskując kolejne rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-5} . Dawkami 0,02 ml kolejnych rozcieńczeń zakażano domózgowo po 2 myszy, a porcjami 0,1 ml po 3 próbówki z hodowlą komórek neuroblastomy. Zakażone myszy obserwowano codziennie przez 30-33 dni. Z tkanki mózgowej myszy padłych w trakcie doświadczenia wykonywano preparat FAT w celu potwierdzenia obecności wirusa.

Test RTCIT wykonano w następujący sposób: trzydniową hodowlę komórek neuroblastomy trypsynowano i ich 0,1 ml porcje w stężeniu 5×10^5 kom./ml dodawano do próbek zawierających 0,1 ml każdego z kolejnych rozcieńczeń supernatantu. Otrzymane mieszaniny inkubowano 1 godzinę w 37°C w atmosferze 5% CO_2 wstrząsając próbówki co 15 minut. Po inkubacji zawartość każdej z ww. próbek przenoszono do próbek Leightona z lamelkami, uzupełniano do 2 ml płynem wzrostowym i inkubowano przez 24, 48 i 72 godziny. Następnie lamelki z hodowlą wyjmowano, płukano w PBS, utrwalano 100% zimnym acetonem i po wysuszeniu barwiono koniugatem IF przez 30 minut w 37°C w komorze wilgotnej. Po barwieniu preparaty płukano 2 razy w kąpeli PBS, 1 raz w wodzie destylowanej i suszono. Następnie lamelki z hodowlą zatapiano na szkiełku podstawowym, w kropli zbuforowanej gliceryny i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym. Poszczególne preparaty wykonane z każdego rozcieńczenia oceniano po 24, 48 i 72 godzinach. Za wynik dodatni uznawano obecność w komórkach neuroblastomy ciałek wtętoowych, typowych dla wirusa wścieklizny. Ujemną kontrolę stanowiła nie zakażona hodowla komórkowa inkubowana i barwiona równolegle z próbami zakażonymi. Dodatnią kontrolę, potwierdzającą wrażliwość komórek neuroblastomy, stanowiła próbka nr 16/71 (tab. 1).

Objaśnienia do tab. 1.: * – wynik bezpośrednich badań mózgu zwierząt w teście FAT; ** – myszy zakażono izolatem w stężeniu od 10^{-4} do 10^{-6} ; + wynik dodatni; +/- wynik wątpliwy; – wynik ujemny; x graniczne rozcieńczenie izolatu, które spowodowało śmierć tylko 1 myszy na 2 zakażone

Tab. 1. Wykrywanie obecności wirusa wścieklizny metodą FAT, RTCIT i MIT w mózgu zwierząt padłych na wściekliznę

| Lp/nr | Gatunek zwierzęcia | FAT* bad. bezp. | Graniczne miano wirusa uzyskane w RTCIT | | |
|--------|--------------------|-----------------|---|-------------------------------------|----------------------|
| | | | miano | wynik testu MIT (śmierć po dniach) | FAT* u padłych myszy |
| 1/92 | lis | + | 10^{-6} | przeżyły wszystkie zakażone myszy** | - |
| 2/93 | lis | + | 10^{-5} | jw. | - |
| 3/94 | lis | + | 10^{-6} | jw. | - |
| 4/95 | lis | + | 10^{-6} | jw. | - |
| 5/96 | lis | + | 10^{-6} | jw. | - |
| 6/111 | jenot | + | 10^{-6} | jw. | - |
| 7/126 | lis | + | 10^{-6} | jw. | - |
| 8/26 | lis | + | 10^{-2} | 10^{-2} (19-21) | + |
| 9/82 | lis | + | efekt cytotoks. | 10^{-2} (21) | + |
| 10/67 | kot | + | 10^{-2} | 10^{-2} (24-25) | + |
| 11/68 | kuna | + | 10^{-3} | 10^{-3} (17-26) | + |
| 12/76 | kuna | + | 10^{-4} | 10^{-3} (26-29) | + |
| 13/56 | jenot | + | 10^{-5} | 10^{-3} (21-22) | + |
| 14/80 | kuna | + | 10^{-2} | 10^{-2} (21-23) | + |
| 15/70 | kot | + | 10^{-3} | 10^{-2} (21) | + |
| 16/71 | lis | + | 10^{-4} | 10^{-3x} (11-20) | + |
| 17/84 | lis | + | efekt cytotoks. | 10^{-3x} (12-16) | + |
| 18/60 | lis | + | 10^{-2} | 10^{-2} (13) | + |
| 19/72 | tchórz | + | 10^{-1} | 10^{-2} (11-20) | + |
| 20/99 | krowa | + | 10^{-2} | 10^{-3} (20-25) | + |
| 21/88 | lis | +/- | 10^{-1} | przeżyły wszystkie zakażone myszy | - |
| 22/87 | jenot | + | 10^{-2} | 10^{-3} (14-19) | + |
| 23/94 | krowa | + | 10^{-3} | 10^{-2} (14-19) | + |
| 24/97 | jenot | + | 10^{-3} | 10^{-4x} (15-19) | + |
| 25/21 | krowa | + | 10^{-3} | 10^{-2} (11-22) | + |
| 26/62 | jenot | + | 10^{-3} | 10^{-3} (12-25) | + |
| 27/66 | lis | + | 10^{-2} | 10^{-2} (14-24) | + |
| 28/72 | lis | + | 10^{-2} | 10^{-2} (20-27) | + |
| 29/134 | jenot | + | 10^{-3} | 10^{-1} (17-21) | + |
| 30/151 | krowa | + | 10^{-3} | 10^{-3x} (13-27) | + |
| 31/153 | lis | + | 10^{-2} | 10^{-3x} (13-17) | + |
| 32/156 | lis | +/- | 10^{-2} | przeżyły wszystkie zakażone myszy | - |
| 33/703 | lis | + | 10^{-4} | 10^{-2} (10-17) | + |
| 34/704 | lis | +/- | - | przeżyły wszystkie zakażone myszy | - |
| 35/708 | lis | + | 10^{-3} | 10^{-3x} (10-22) | + |
| 36/755 | jenot | + | 10^{-2} | 10^{-1} (17-20) | + |
| 37/768 | lis | + | 10^{-3} | 10^{-3} (12-19) | + |
| 38/792 | lis | + | 10^{-4} | 10^{-3x} (17-23) | + |
| 39/733 | lis | + | 10^{-3} | 10^{-4} (7-21) | + |
| 40/737 | jenot | + | 10^{-3} | 10^{-4x} (14-23) | + |
| 41/809 | lis | + | 10^{-5} | 10^{-4} (14-33) | + |
| 42/810 | lis | + | 10^{-1} | 10^{-3x} (15-25) | + |
| 43/147 | lis | + | 10^{-5} | 10^{-4} (14-27) | + |

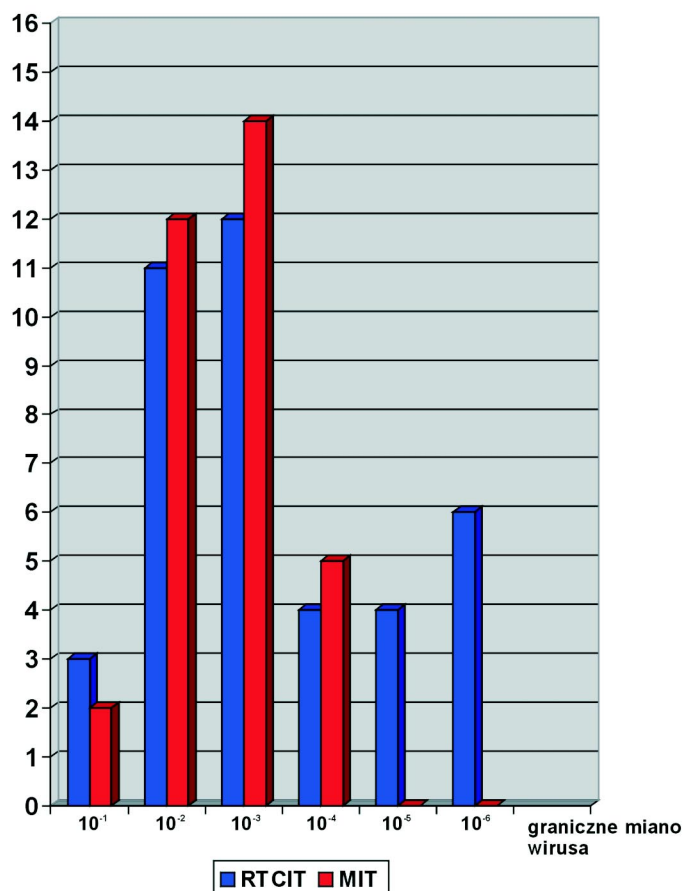
Wyniki i omówienie

Wyniki badań porównawczych nad wykrywaniem RV metodą FAT, RTCIT i MIT u badanych zwierząt przedstawiono w tabelach 1 i 2 oraz na ryc. 1 i 2.

Obecność antygeny RV w tkance mózgowej badanych zwierząt wykryto w 40 przypadkach (93%) testem FAT i RTCIT, a badaniem MIT w 33 próbkach (91,6%) (tab. 1, 2).

Wyniki zbieżne w testach RTCIT i MIT stwierdzono w 12 próbkach (27,9%). Reakcję dodatnią w RTCIT w wyższym rozcieńczeniu supernatantu od użytego w MIT uzyskano w 21 próbkach (48,8%). Reakcję dodatnią w MIT w wyższym rozcieńczeniu inokulum niż w RTCIT uzyskano w 10 próbkach (23,2%) (tab. 1, ryc. 2). Na uwagę zasługują próbki nr 9 i 17, w których cytotoksyczność w stosunku do komórek neuroblastomy uniemożliwiła odczyt. W przypadku próbki nr 9 efekt cytotoksyczny w RTCIT obserwowano we wszystkich rozcieńczeniach inokulum, natomiast w MIT z objawami porażennymi padły tylko myszy zakażone rozcieńczeniem inokulum 10^{-2} . Stężenie inokulum 10^{-1} tej próbki okazało się dla nich również toksyczne, powodując śmierć po 24 godzinach po zakażeniu, co uznano za odczyn nieswoisty. W przypadku próbki nr 17 efekt cytotoksyczny w RTCIT spowodowało tylko inokulum w rozcieńczeniu 10^{-1} i 10^{-2} ,

liczba próbek



Ryc. 1. Graniczne miano wirusa wścieklizny w poszczególnych próbkach wykryte testem RTCIT i MIT

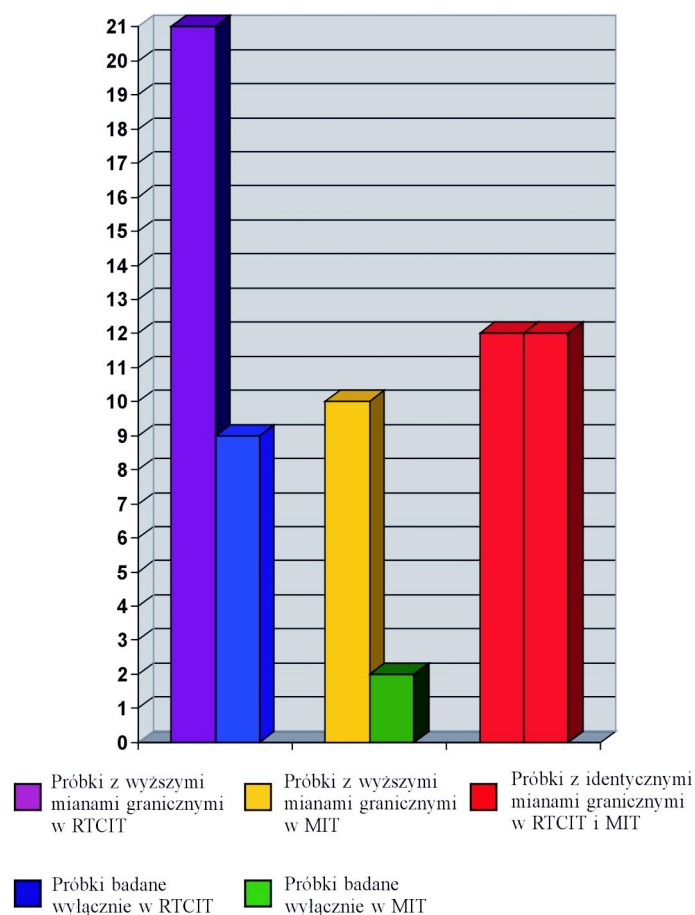
Tab. 2. Zestawienie wyników pozytywnych uzyskanych w bezpośrednim badaniu FAT i próbach izolacji wirusa w testach RTCIT i MIT

| Wynik | Badanie bezp. | | Próba izolacji wirusa | |
|------------------------------------|---------------|-------|-----------------------|--------|
| | FAT | RTCIT | RTCIT | MIT |
| L. prób dodatnich/L. prób badanych | 40/43 | 40/43 | 40/43 | 33/36* |
| % | 93,0 | 93,0 | 93,0 | 91,6 |

Objaśnienia: * – nie uwzględniono wyników badań próbek nr 1-7 (tab. 1), ponieważ nie wykonano testu z koncentracjami tkanki niższymi od 10^{-4}

a hodowle zakażone jego wyższymi rozcieńczeniami (od 10^{-3} do 10^{-5}) nie wykazały obecności wtretów cytoplazmatycznych. Natomiast myszy zachorowały i padły po otrzymaniu inokulum tej próbki w rozcieńczeniach 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3} , przy czym rozcieńczenie 10^{-3} spowodowało śmierć tylko 1 myszy z 2 zakażonych. Obydwie próbki (nr 9 i 17) stanowiła tkanka mózgowa lisów wykazująca cechy rozkładu gnilnego (tab. 1). Poza tym w badaniach bezpośrednich (FAT) mózgow trzech lisów uzyskano wyniki, których nie można było uznać bez zastrzeżeń za pozytywne, stąd zostały określone mianem wątpliwych. Próby izolacji wirusa z mózgu jednego z lisów (nr 34) dały wynik negatyw-

liczba próbek



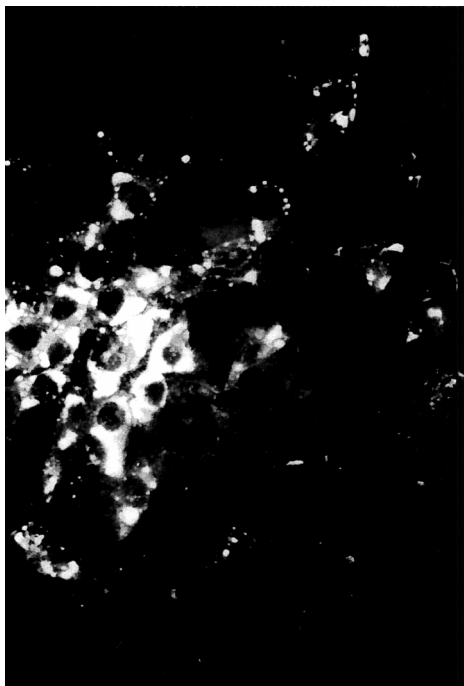
Ryc. 2. Porównanie mian granicznych w testach RTCIT i MIT

ny w testach RTCIT i MIT, natomiast w przypadku dwu pozostałych (nr 21 i 32) wirus wyosobniono jedynie w hodowli komórek neuroblastomy, przy ujemnych wynikach próby biologicznej (tab. 1).

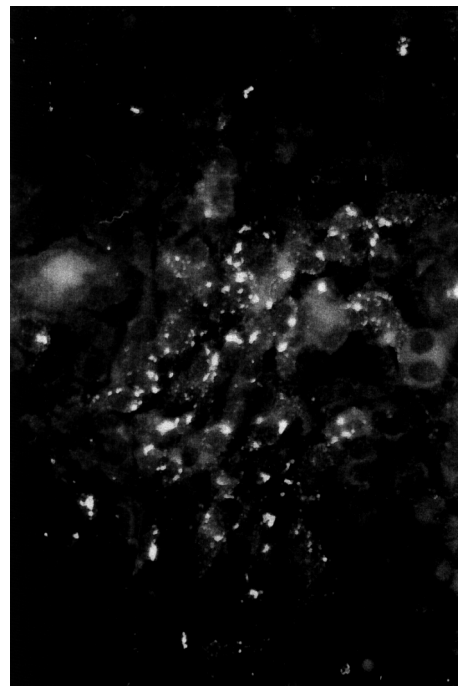
Graniczne miano wirusa (ryc. 1), tzn. najwyższe rozcieńczenie supernatantu, w którym wykrywano obecność wirusa w poszczególnych próbkach, w RTCIT wynosiło: dla 3 próbek (6,9%) 10^{-1} , dla 11 próbek (25,5%) 10^{-2} , w 12 próbkach (27,9%) 10^{-3} , w 4 próbkach (9,3%) 10^{-4} i 10^{-5} oraz w 6 próbkach (13,9%) 10^{-6} . Natomiast w MIT graniczne inokulum 10^{-1} stwierdzono w 2 próbkach (4,6%), 10^{-2} w 12 próbkach (27,9%), 10^{-3} w 14 próbkach (32,5%) i 10^{-4} w 5 próbkach (11,6%) (tab. 2, ryc. 1). W 9 przypadkach graniczne rozcieńczenie inokulum wywołało objawy wścieklizny tylko u jednej z dwóch zakażonych myszy podczas 4 tygodni obserwacji. Były to: 7 rozcieńczeń 10^{-3} oraz 2 supernatanty podane w rozcieńczeniu 10^{-4} (tab. 1).

W RTCIT po 24-godzinnej inkubacji od 5% do 20% komórek rozrzuconych na całej powierzchni preparatu wykazywało swoiste wtręty cytoplazmatyczne. Ich odsetek wzrastał po 48-godzinnej inkubacji do ok. 30-40%. W tym czasie wirus atakował przyległe komórki, tworząc ogniska złożone z kilku do kilkunastu komórek zawierających jasno świecące wtręty cytoplazmatyczne. W większości próbek dodatnich po tym czasie obserwowano także najwyraźniejszą reakcję, zwłaszcza w tych, które po 24 godzinach ujawniały obecność tylko nielicznych wtrętów rozrzuconych w obrazie preparatu. Po 72-godzinnej inkubacji obraz mikroskopowy poszczególnych próbek ulegał niewielkim zmianom. W niektórych preparatach zwiększała się liczba komórek zaatakowanych przez wirus w ogniskach zakażenia, ale w części ognisk świecenia były mniej ostre niż po 48 godzinach, prawdopodobnie z powodu uwalniania się cząstek wirusa do płynu hodowlanego. Poza tym po 3-dniowej inkubacji narastająca warstwowo hodowla komórkowa często utrudniała odczytanie wyników (ryc. 3, 4).

Nie zaobserwowano związku między zakaźnością wirusa dla komórek neuroblastomy a czasem występowania objawów choroby i śmierci u myszy domózwgowo zakażonych tym samym rozcieńczeniem supernatantu. Dowodem tego były próbki nr 1-7, w których w teście RTCIT obserwowano liczne i rozległe ogniska wirusa rozrzucone na powierzchni preparatu. Odsetek komórek zakażonych kolejnymi rozcieńczeniami



Ryc. 3. Preparat nr 16. Komórki neuroblastomy po 48-godzinnej inkubacji z homogenatem tkanki mózgowej lisa rozcieńczonej 10^{-2} . Barwienie techniką FAT, pow. 100-200 ×



Ryc. 4. Preparat nr 11. Komórki neuroblastomy po 72-godzinnej inkubacji z homogenatem tkanki mózgowej kuny rozcieńczonej 10^{-3} . Barwienie techniką FAT, pow. 100-200 ×

mi inokulum wynosił 40-70%. Ze względu na szczególnie wyraźną ekspresję wirusa w tych próbkach uwidocznioną w komórkach neuroblastomy badanie RTCIT rozszerzono, sporządzając kolejne, wyższe rozcieńczenie inokulum (10^{-6}), zakażając myszy tym razem supernatantem w stężeniu od 10^{-4} do 10^{-6} (tab. 1). Obecność małych ognisk wirusa złożonych z kilku zakażonych komórek neuroblastomy stwierdzono w sześciu preparatach w rozcieńczeniu 10^{-6} , a w jednej próbce w rozcieńczeniu 10^{-5} . W badaniu MIT 4-tygodniowy czas obserwacji myszy okazał się zbyt krótki dla ekspresji wirusa w wysoko rozcieńczonym supernatancie (10^{-4} - 10^{-6}) tych próbek. Natomiast w próbkach nr 8, 10, 14, 18, 19 i 42 obserwowano niską ekspresję wirusa w RTCIT wyrażającą się po 24 godzinach obecnością 5-10% zakażonych komórek, których odsetek wzrastał do ok. 20% w dalszym cyklu obserwacji. Tu jednak inokulum pochodzące z każdej z tych próbek okazało się śmiertelne dla myszy w czasie od 11. do 25. dnia po zakażeniu.

U wszystkich zakażonych domózwgowo myszy, które padły w objawach wścieklizny, potwierdzono obecność RV w mózgu metodą FAT.

Uzyskane wyniki nie różnią się zasadniczo od wcześniejszych badań, które dowodzą, że RTCIT jest tak samo czuły w wykrywaniu zakażenia wirusem wścieklizny jak MIT (5, 14, 18, 23). W wymienionych badaniach różnice w czułości obydwu testów wystąpiły, gdy zakażano myszy i komórki neuroblastomy inokulum z niską koncentracją wirusa, uzyskując testem RTCIT najwyższy odsetek reakcji dodatnich. Potwierdzeniem wysokiej czułości RTCIT były próbki nr 21 i 32 pre-

zentowanych badań, w których uzyskano wynik wątpliwy w FAT, natomiast dodatni w RTCIT (w rozcieńczeniu 10^{-1} (pr. nr 21) i 10^{-2} (pr. nr 32)) oraz ujemny w MIT. W preparacie mikroskopowym tych próbek badanych testem RTCIT nieliczne wtręty cytoplazmatyczne w komórkach neuroblastomy widoczne były dopiero po 48-godzinnej inkubacji. Sądzić więc można, że próbki te zawierały niskie koncentracje wirusa, mimo że jego obecność w próbce nr 32 wykryto jeszcze w rozcieńczeniu 10^{-2} . Prawdopodobnie zakażone nimi myszy wykazałyby objawy choroby po przedłużonym okresie obserwacji (> 1 mies.).

Ponadto, w wymienionych badaniach różnice w czułości obydwu testów wystąpiły również, gdy użyto jako inokulum materiału w stanie rozkładu gnilnego, który powodował lizę komórek neuroblastomy (18, 23). Potwierdzeniem tych obserwacji są uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki 2 próbek (nr 9 i 17) pobranych z nieświeżego materiału. Poddanie obydwu supernatantów działaniu antybiotyków przez 1 godz. w temperaturze lodówki zahamowało wprawdzie namnażanie bakterii, ale obecne w nich toksyny spowodowały lizę części komórek, a pozostałe unosiły się w płynie hodowlanym. W próbce nr 17 efekt toksyczny w stosunku do komórek hodowli wystąpił tylko w dwóch pierwszych rozcieńczeniach. Uzyskane wyniki sugerują potrzebę sporządzania kilku kolejnych rozcieńczeń supernatantu przy wykonywaniu RTCIT, w celu zmniejszenia stężenia lub wyeliminowania ewentualnych toksycznych substancji z badanej próbki.

Hamując na ekspresję wirusa na komórkach neuroblastomy może oddziaływać również nie rozcieńczony homogenat tkanki mózgowej (18, 19) bogatej w gangliozydy i fosfolipidy (21, 22). Jednak Kulonen i wsp. (14) nie potwierdzili tej obserwacji. Sporządzając kolejne rozcieńczenia (od 10^{-1} do 10^{-5}) tkanki mózgowej naturalnie zakażonych zwierząt (szopy, lisy, byk domowy) przy użyciu supernatantu mózgu zdrowego prosięcia, w większości przypadków otrzymali wyższe graniczne miana wirusa w RTCIT niż w MIT. Tylko w 2 przypadkach (2 szopy) testem RTCIT wykryto mniejsze koncentracje wirusa. Autorzy podkreślają wysoką czułość RTCIT.

Niepodważalną przewagą RTCIT nad MIT jest znacznie krótszy czas (1-4 dni) potrzebny do wykazania obecności wirusa w badanym materiale (2, 8, 24). W prezentowanych badaniach we wszystkich dodatnich próbkach w RTCIT obecność wtrętów stwierdzano najpóźniej po 48-godzinnej inkubacji, natomiast w MIT wirus powodował śmierć myszy najwcześniej 7. dnia (próbka nr 39, tab. 1), gdy w pozostałych przypadkach efekt ten uzyskiwano w okresie od 10. do 26. dnia po zakażeniu (tab. 1). Najdłuższe okresy przeżycia, wynoszące 25-33 dni, obserwowano po podaniu myszom granicznych rozcieńczeń próbek nr 10-12, 20, 26, 28, 30, 41-43 (tab. 1). Długi okres wylegania choroby u większości tych myszy można tłumaczyć niską koncentracją wirusa w inokulum. Podobne wyniki

uzyskali Kulonen i wsp. (14). W ich doświadczeniu myszy wykazywały symptomy choroby dopiero po 28 i 29 dniach po inokulacji i fakt ten uzasadniają nie tylko wysokim rozcieńczeniem zarazka, lecz również specyficznymi właściwościami biologicznymi dzikiego arktycznego wirusa wścieklizny. Różnice w ekspresji RV u zakażonego zwierzęcia, które Baer i wsp. (4) tłumaczą różną inwazyjnością dzikich szczepów RV, zaobserwowali również Larghi i Diaz (15) oraz Skalka (20). Webster (25) z kolei wykazał, że wirus pochodzący z mózgu i gruczołu ślinowego tego samego zwierzęcia powodował śmierć myszy pochodzących z jednego szczepu w różnym czasie po zakażeniu. Różnice w jego ekspresji w MIT mogły powodować, obecne w zawiesinach niektórych tkanek (mózgowej, gruczołu ślinowego), przeciwciała neutralizujące wirus (3, 6, 7, 16). Poronną postać wścieklizny opisali m.in. Bell (6), Bell i wsp. (7) oraz Londmel i wsp. (16) u myszy zakażonych dootrzewnowo. W jej przebiegu nie wykazano obecności wirusa w mózgu zakażonych zwierząt. Stwierdzono natomiast neutralizujące go przeciwciała w mózgu i surowicy krwi.

Replikację RV u zakażonego zwierzęcia hamować mogą również niekompletne cząsteczki wirusa (DI – defective interfering particles), chociaż ich interferencja z namnażaniem RV *in vivo* nie została jednoznacznie potwierdzona (6, 10, 11).

Natomiast obecność cząstek DI, wzbudzonych wysoką koncentracją wirusa, stwierdzano często w różnych hodowlach komórkowych wrażliwych na RV (1, 9, 13). Stąd też, aby zapobiec tworzeniu się niekompletnych cząstek wirusa, Seroka zaleca wykonywanie RTCIT w 2 kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeniach inokulum (19).

Zmniejszona ekspresja RV na komórkach neuroblastomy może być również spowodowana stopniową utratą wrażliwości tych komórek po wielokrotnych jej pasażach. Dlatego też włączenie RTCIT do rutynowej diagnostyki zakażeń wirusem wścieklizny wiąże się z koniecznością dysponowania dużym zasobem komórek zmagazynowanych w ciekłym azocie.

Wyniki prezentowanych badań, podobnie jak innych autorów (14, 17, 18, 23), dowodzą, że RTCIT jest zdolny wykryć niskie koncentracje RV w badanej próbce. Wysoka czułość testu oraz szybsza ekspresja wirusa (1-4 dni) w komórkach neuroblastomy niż w mózgu zakażonych myszy (w obecnym badaniu 7-33 dni, tab. 1) daje możliwość przyspieszenia postępowania epidemiologicznego i epizootycznego, co jest uzasadnieniem dla włączenia testu RFFIT do rutynowej diagnostyki wścieklizny. Jednak zastępując test MIT testem RTCIT należy mieć na uwadze ograniczenia testu RTCIT (cytotoksyczne próbki, cząstki DI, stopniową utratę wrażliwości komórek neuroblastomy po wielokrotnych pasażach) oraz fakt, że wykonanie tego testu wymaga wirusologicznego wyposażenia pracowni diagnostycznej i wysoko wykwalifikowanego personelu. Ponadto należy podkreślić, że test RTCIT, po-

dobnie jak MIT, nie wykaże obecności nieaktywnych (nieżywych) cząstek wirusa pochodzących np. z nieodpowiednio przechowywanych zwłok zakażonego zwierzęcia. W tym przypadku wskazane jest zastosowanie testu FAT bezpośrednio z tkanki mózgowej podejrzanego zwierzęcia lub testu RRIED (rapid rabies enzyme immuno-diagnosis – rodzaj testu immunoenzymatycznego typu ELISA wykrywający antygeny nukleokapsydu RV) lub metody PCR (polimerase chain reaction – wykrywającej kwas nukleinowy wirusa), które umożliwiają wykrycie zarówno aktywnych, jak i nieaktywnych cząstek RV w tkance mózgowej zakażonego zwierzęcia.

Piśmiennictwo

1. *Andzhaparidze O. G., Bogomolova N. N., Boriskin Y. S., Bektemirova M. S., Drynov I. D.*: Comparative study of rabies virus persistence in human and hamster cell lines. *J. Virol.* 1981, 37, 1-6.
2. *Anon.*: OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Rabies. Paris 1992, 204-215.
3. *Arko J. R., Schneider L. G., Baer G. M.*: Nonfatal canine rabies. *Am. J. Vet. Res.* 1973, 34, 937-938.
4. *Baer G. M., Cleary W. F., Diaz A. M., Perl D. F.*: Characteristics of 11 rabies virus isolates in mice: titers and relative invasiveness of virus, incubation period of infection, and survival of mice with sequelae. *J. Infect. Dis.* 1977, 136, 336-344.
5. *Barrat J., Barrat M. J., Picard M., Aubert M. F. A.*: Diagnostic de la rage sur culture cellulaire. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1988, 11, 207-214.
6. *Bell J. F.*: Abortive rabies infection. 1. Experimental production in white mice and general discussion. *J. Infect. Dis.* 1964, 114, 249-257.
7. *Bell J. F., Lodmell D. L., Moore G. J., Raymond G. H.*: Brain neutralization of rabies virus to distinguish recovered animals from previously vaccinated animals. *J. Immunol.* 1966, 97, 747-753.
8. *Bourhy H., Sureau P.*: Laboratory Methods for Rabies Diagnosis. Commission des Laboratoires de Reference et d'expertise de L'Institut Pasteur, 1990.
9. *Clark H. F.*: Rabies serogroup viruses in neuroblastoma cells: propagation, „autointerference”, and apparently random back-mutation of attenuated viruses to the virulent state. *Infect. Immun.* 1980, 27, 1012-1022.
10. *Clark H. F., Parks N. F., Wunner W. H.*: Defective interfering particles of fixed rabies viruses: lack of correlation with attenuation or auto-interference in mice. *J. Gen. Virol.* 1981, 52, 245-258.
11. *Holland J. J., Villarreal L. P.*: Purification of defective interfering T particles of vesicular stomatitis and rabies viruses generated in vivo in brains of newborn mice. *Virology* 1975, 67, 438-449.
12. Instrukcja Nr 27 Ministerstwa Rolnictwa – Departamentu Weterynarii z dnia 16 kwietnia 1973 r. (Wet-L.640/1/73) w sprawie laboratoryjnego rozpoznawania wścieklizny u zwierząt.
13. *Kawai A., Matsumoto S., Tanabe K.*: Characterization of rabies viruses recovered from persistently infected BHK cells. *Virology* 1975, 67, 520-523.
14. *Kulonen K., Neuvonen E., Topi M.*: Methods for detecting arctic rabies virus in dilution series of field samples. *J. Virol. Meth.* 1991, 32, 149-155.
15. *Larghi O. P., Diaz A. M. O.*: Cross protection of mice against different rabies virus isolates. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 1985, 259, 268-274.
16. *Lodmell D. L., Bell F. J., Moore G. J., Raymond G. H.*: Comparative study of abortive and nonabortive rabies in mice. *J. Infect. Dis.* 1969, 119, 569-580.
17. *Molenda J., Otachel-Hawranek J.*: Izolacja wirusa wścieklizny na komórkach mysiej neuroblastomy. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 823-825.
18. *Rudd R. J., Trimarchi C. V.*: Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 2522-2528.
19. *Seroka D., Koncki A., Łabuńska E.*: Izolacja i namnażanie wirusa wścieklizny na liniach komórkowych w warunkach rutynowej diagnostyki wścieklizny. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1994, 46, 215-223.
20. *Skalka P.*: Zachyt wiru wścieklizny u myślowca kuniho na uzemi CSR. *Veterinarstvi* 1986, 36, 558-559.
21. *Superti F., Hauttecoeur B., Morelec M. J., Goldoni P., Bizzini B., Tsiang H.*: Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J. Gen. Virol.* 1986, 67, 47-56.
22. *Superti F., Seganti L., Tsiang H., Orsi N.*: Role of phospholipids in Rhabdovirus attachment to CER cells. *Arch Virol.* 1984, 81, 321-328.
23. *Webster W. A.*: A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can. J. Vet. Res.* 1987, 51, 366-369.
24. *Webster W. A., Casey G. A.*: Virus isolation in neuroblastoma cell culture, [w:] *Laboratory Techniques in Rabies*. Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (wyd.). WHO, Geneva 1996, 96-104.
25. *Webster W. A., Charlton K. M., Casey G. A.*: Growth characteristics in cell culture and pathogenicity in mice of two terrestrial rabies strains indigenous to Canada. *Can. J. Microbiol.* 1988, 34, 19-23.

Adres autora: dr Joanna Otachel-Hawranek, ul. gen. K. Pułaskiego 52, 50-900 Wrocław; e-mail: zhw.wroclaw@wroc.wiw.gov.pl