

## УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕВРИНОМЫ ГАССЕРОВА УЗЛА КРЫСЫ (НГУК-1)

Н.А. Хисматуллина<sup>1,2</sup>, А.М. Гулюкин<sup>1,4</sup>, Э.А. Шуралев<sup>1,2</sup>, К.С. Хаертынов<sup>1,3</sup>, А.Н. Чернов<sup>1</sup>,  
М.Н. Филимонова<sup>2</sup>, А.Ф. Авзалова<sup>1</sup>, А.В. Паршикова<sup>4</sup>, А.В. Иванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия

<sup>4</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, Москва, Россия

### Rapid Diagnostic Test of Rabies Using Rat Gasser's Ganglion Neurinoma Cell Culture (RGGN-1)

N.A. Khismatullina<sup>1,2</sup>, A.M. Gulyukin<sup>1,4</sup>, E.A. Shuralev<sup>1,2</sup>, K.S. Khaertynov<sup>1,3</sup>, A.N. Chernov<sup>1</sup>,  
M.N. Filimonova<sup>2</sup>, A.F. Avzalova<sup>1</sup>, A.V. Parshikova<sup>4</sup>, A.V. Ivanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

<sup>4</sup> Y.R. Kovalenko Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Moscow, Russia

Представлены результаты сравнительного изучения диагностической ценности метода выделения уличного вируса бешенства в культуре клеток невринома Гассерова узла крысы (НГУК-1) и биопробы на белых мышах. Показано, что метод выделения вируса в культуре клеток НГУК-1 не уступает по чувствительности классической биопробе на белых мышах и имеет явные преимущества, состоящие в сокращении времени постановки диагноза (до 3 сут. в культуре клеток НГУК-1 против 30 сут. на белых мышах согласно ГОСТу) и его экономичности.

Метод заражения линии клеток НГУК-1 рекомендован для включения в ГОСТ для ускоренной диагностики бешенства и выделения уличного рабического вируса, который следует рассматривать как возможную замену биопробы на белых мышах.

Ускоренная диагностика бешенства в культуре клеток НГУК-1 обеспечит раннюю диагностику бешенства у животных, что в свою очередь снизит риск заболевания животных и людей.

**Ключевые слова:** бешенство, ускоренная диагностика, перевиваемая культура клеток НГУК-1.

Бешенство остается постоянной угрозой для человечества во многих странах мира. Несмотря на значительные успехи в его изучении, борьба с ним затруднена из-за широкой циркуляции вируса в природе. Проблема остается актуальной в связи с летальным исходом каждого случая и необходимостью проведения беспрецедентно напряженного курса лечебно-профилактических прививок [1–4].

Ситуация по заболеваемости бешенством в России характеризуется как крайне неблагоприятная [1–3]. За последние 20 лет в России регистрируется самая высокая смертность среди развитых стран [5]. За 2008–2012 гг. зарегистрирован 61 случай бешенства [6]. Ежегодно в стране антирабическую помощь получают от 250 до 450 тыс. человек.

При проведении противозoonотических мероприятий и назначении курса антирабических прививок пострадавшим от укуса животных немаловажное значение имеет своевременная и точная диагностика. Диагноз считается установленным при получении положительного результата хотя бы по одному лабораторному тесту, входящему в ГОСТ 26075-84 [7]. При отрицательных результатах ставится классическая

The results of the comparative study of the diagnostic efficacy of the method of isolation of street rabies virus using rat Gasser's ganglion neurinoma cell culture (RGGN-1) and biological tests on white mice are presented. It is shown that the method of virus isolation using RGGN-1 cell culture is not inferior in the sensitivity to the classic bioassay on white mice and has obvious advantages, such as reducing the time of diagnosis (up to 3 days using RGGN-1 compared to 30 days using white mice) and its cost-effectiveness.

Method of cell line RGGN-1 infection is recommended for inclusion in the Standards for the rapid diagnosis of rabies and isolation street rabies virus, which should be considered as a possible replacement of bioassays on white mice.

Rapid diagnosis of rabies using RGGN-1 cell culture will provide early diagnosis of rabies in animals to reduce the risk of disease in human and animals.

**Key words:** rabies, express diagnostics, RGGN-1 cell culture.

биопроба на белых мышах. В настоящее время биопроба на белых мышах является наиболее надежным методом лабораторной диагностики бешенства и выделения рабического вируса [8]. Вместе с тем, применяемые методы лабораторной диагностики бешенства, входящие в ГОСТ 26075-84, имеют те или иные недостатки. Так, обнаружение телец Бабеша – Негри и реакция преципитации в агаровом геле – недостаточно эффективные тесты. Метод флуоресцирующих антител по чувствительности также уступает методике интрацеребрального заражения лабораторных животных. Однако и биопроба на белых мышах не лишена недостатков: трудоемка, неэкономична и требует сравнительно продолжительного наблюдения за подопытными животными (от 7 до 30 сут. и более, согласно существующему ГОСТу [7]).

За рубежом имеются сообщения о перспективности метода выделения уличных штаммов вируса бешенства на линии глиальных клеток нейробластомы мыши, клон 18 и 1300, а также на клетках CER и ВНК-21 [9–16]. Авторами показана эквивалентность тестов в культуре клеток и биопробы на мышах, достигающая соответствия до 93,75%.

e-mail: nailaanvar@gmail.com

В нашей стране имеются сообщения о применении перевиваемой культуры клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) для выделения уличных штаммов рабического вируса с последующим обнаружением рабического антигена с помощью метода флуоресцирующих антител (МФА) [17–22]. Тест в культуре клеток НГУК-1 рассматривается как контрольный, подтверждающий МФА и дополняющий тест инокуляции мышей. Необходимо отметить, что упомянутые выше исследования выполнены с нашим участием.

В данной работе целью исследований явилось дальнейшее изучение диагностической ценности метода выделения уличного вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 с использованием большего количества материалов, а также сравнительное изучение диагностической ценности клеточных линий: НГУК-1, почки нормальной взрослой самки кокер-спаниеля (МДСК), почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и биопробы на белых мышах.

### Материал и методы

Выделение эпизоотических штаммов вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 проводили согласно Методическим указаниям по лабораторной диагностике бешенства, утвержденным Департаментом ветеринарии МСХиП РФ 14.05.1997 [23]. Наличие вируса в культуральной жидкости определяли интрацеребральной инокуляцией белых мышей. Биологическую пробу проводили согласно ГОСТу 26075-84 [7].

Для заражения клеток использовали изоляты уличного вируса бешенства (УВБ), выделенные из мозга человека и различных видов животных. Всего исследовано 554 пробы патологоанатомического материала, из них 187 получено от различных видов диких животных, 324 – от сельскохозяйственных и домашних животных и 43 – от людей, умерших от бешенства. Материалы зарегистрированы в коллекции лаборатории профилактики бешенства и природной очаговости вирусных зоонозов ИПВЭ РАМН им. М.П. Чумакова (Москва), поступивших из разных практических учреждений для диагностических исследований или добыты сотрудниками этой лаборатории при изучении природных очагов рабической инфекции. Исследовали также патологический материал (головной мозг) от диких, сельскохозяйственных и домашних животных, поступивших с подозрением на бешенство из неблагополучных по заболеваемости бешенством районов Республики Татарстан. Анализ клеток на наличие антигена вируса бешенства проводили прямым МФА через каждые 24 ч в течение 5–6 сут. после внесения проб [23]. В качестве положительных контролей использовали препараты клеток, зараженных стандартным вирусом бешенства, штаммом CVS и(или) производственным штаммом «Овечий» ГНКИ рабического вируса. Отрицательным контролем служили препараты клеток, обработанные 10% суспензией мозга интактных белых мышей. Препараты просматривали под люминесцентным микроскопом Nikon (Japan) под иммерсией при увеличении  $10 \times 1000$ . Для окраски их использовали «Флуоресцирующий антирабический глобулин», разработанный и изготовленный в условиях лаборатории иммунологии и биохимии ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань), зарегистрированный в Российской Федерации и сертифицированный

в ВГНКИ (Москва). Учет результата проводили по оценке интенсивности свечения по 4-крестовой системе. Пробу считали положительной при отчетливо выраженной, достаточно яркой желто-зеленой люминесценции, при отсутствии таковой в контрольных отрицательных препаратах.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследований с применением изолятов вируса бешенства показали, что уличный рабический вирус размножается в культуре клеток НГУК-1, в то время как его репликация не установлена в культуре клеток МДСК и СПЭВ. В цитоплазме клеток НГУК-1, зараженных вирусомсодержащим материалом, обнаруживали желтовато-зеленые, яркосветящиеся комплексы, расположенные преимущественно в ее перинуклеарной зоне. Так, в 1 день инкубации специфически светящиеся включения обнаружены в единичных клетках. Но уже на 2 сут. происходило увеличение размеров специфически флуоресцирующих гранул (0,4; 0,5 мкм), а также количества инфицированных клеток, достигающее  $19,5 \pm 0,3\%$ . В культуре клеток, инкубированных в течение 3 сут. после заражения, отмечено возрастание размеров флуоресцирующих гранул до 0,7–2,0 мкм и количества инфицированных клеток, составившие  $27,5 \pm 1,2\%$  (рис. 1, 2).

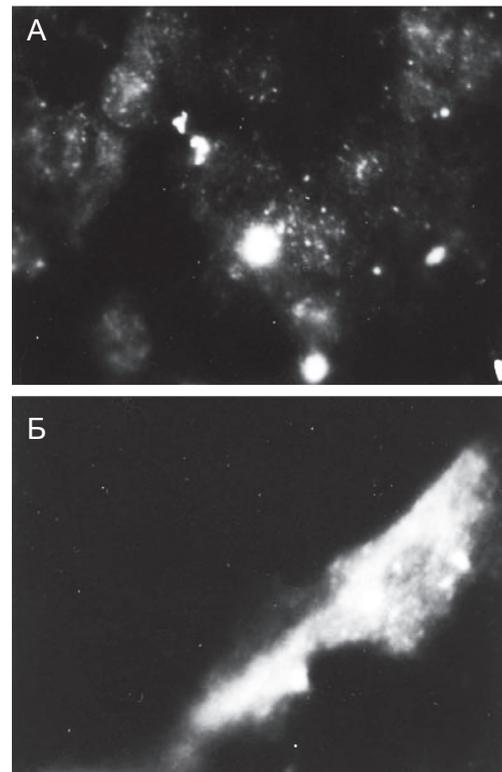


Рис. 1. Культуры перевиваемых клеток НГУК-1 через 72 ч после внесения 10% суспензии мозга человека, умершего от бешенства: А – изолят «М»; Б – изолят «Х». Окраска флуоресцирующим антирабическим глобулином. Флуоресцентная микроскопия. Ув.  $\times 1000$

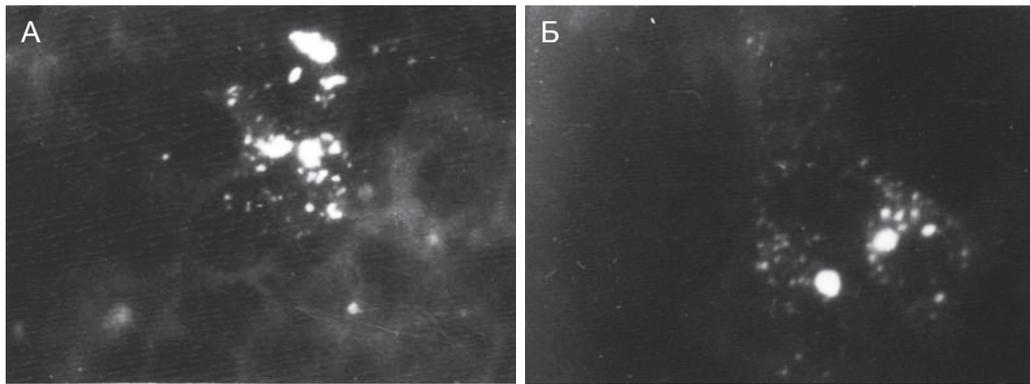


Рис. 2. Культуры перевиваемых клеток НГУК-1 через 72 ч после внесения 10% суспензии мозга лисицы, павшей от бешенства: А – изолят «Л1»; Б – изолят «Л2». Окраска флуоресцирующим антирабическим глобулином. Флуоресцентная микроскопия. Ув.  $\times 1000$

Вирусный антиген в зараженных клетках обнаруживали по МФА через 24–48 ч. Максимальное накопление уличного вируса бешенства наблюдалось на 3 день после заражения. Положительный ответ в этот срок исследований получен в 100% случаев. Специфичность результатов подтверждена интрацеребральным заражением белых мышей культуральной жидкостью.

Согласно ГОСТу 26075-84, в качестве метода выделения возбудителя бешенства рекомендуется биологическая проба на белых мышах. Отсюда важно было изучить в сравнительном аспекте диагно-

стическую ценность выделения вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 и путем первичного интрацеребрального заражения белых мышей.

В таблице 1 приведены результаты сравнительного диагностического исследования материала. Из нее следует полное совпадение результатов выделения уличного вируса бешенства биопробой на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1. Наличие вируса в культуре клеток, установленное методом флуоресцирующих антител, подтверждено заражением белых мышей культуральной жидкостью.

Таблица 1. Результаты исследования мозга различных животных и людей биопробой, по МФА и в культуре клеток НГУК-1

Источник выделения	Количество проб	Положительный результат			
		Биопроба	МФА	Заражение клеток НГУК-1	
				МФА	Заражение мышей культуральной жидкостью
Лисица	178	74	73	74	74
Куница	2	2	2	2	2
Барсук	5	5	5	5	5
Рысь	2	2	2	2	2
Крупный рогатый скот	111	62	61	62	62
Лошадь	25	25	24	25	25
Овца	19	10	10	10	10
Собака	120	45	44	45	45
Кошка	49	20	20	20	20
Человек	43	25	24	25	25
Контроль (10% суспензия мозга интактных мышей)	30	–	–	–	–
Контроль (10% суспензия мозга мышей, зараженных вирусом бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ)	30	30	30	30	30

В контроле, где клетки НГУК-1 инкубировали с мозговой взвесью от клинически здоровых животных, при окрашивании их флуоресцирующим антирабическим глобулином, специфических гранул не обнаруживали.

Для сравнения чувствительности тестов по обнаружению уличного вируса бешенства (УВБ) в клетках НГУК-1 и биопробой на белых мышах были проведены исследования по параллельному титрованию. Показано полное совпадение результатов биопробы на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1 (табл. 2).

Согласно данным таблицы 2, УВБ может быть выделен в клетках НГУК-1 через 1–3 сут. после заражения. При этом инкубационный период для данных изолятов уличного рабического вируса составил от 7 до 34 сут.

В диагностике бешенства уделяется значительное внимание выделению УВБ в культуре клеток. Определенный интерес, на наш взгляд, заслуживают работы, посвященные выделению возбудителя болезни в культуре клеток на известных перевиваемых (ВНК-21, 46-47, CER, Wi-38 и др.) и первичных культурах клеток почки сирийского хомяка, собаки и др. [13, 15, 24, 25]. Однако следует отметить, что указанные перевиваемые линии клеток недостаточно чувствительны для репликации уличных штаммов рабического вируса и не отвечают требованиям для диагностического применения, а для индикации уличного вируса бешенства на первичных культурах клеток почки сирийского хомяка, собаки и др. требуется длительная адаптация (до 20 и более суток после заражения), что снижает ее преимущество перед биопробой на белых мышах.

Привлекает к себе внимание использование опухолевых глиальных клеток для диагностики бешенства с последующим выявлением цитоплазма-

тических включений с помощью световой микроскопией спустя 2–5 сут. после заражения [26]. Однако световая микроскопия для этих целей применяется мало. Золотым стандартом в диагностике бешенства является МФА [27].

Нами показана высокая чувствительность отечественной перевиваемой культуры клеток невральное происхождения НГУК-1 к репликации уличного вируса бешенства, не требующей длительной адаптации вируса к культуре клеток, с последующим выявлением цитоплазматических включений по МФА. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее нами и другими исследователями [17–21], где тест в культуре клеток НГУК-1 рассматривается как контрольный, подтверждающий МФА и дополняющий тест инокуляции мышей. В данной работе представлены результаты дальнейшего изучения диагностической ценности метода выделения уличного вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 с использованием большего количества материалов в сравнении с культурами перевиваемых клеток МДСК, СПЭВ и биопробой на белых мышах. Нами показано, что уличный рабический вирус размножается в культуре клеток НГУК-1, в то время как его репликация не установлена в культурах клеток МДСК и СПЭВ. В цитоплазме клеток НГУК-1, зараженных вирусосодержащим материалом, обнаруживали желтовато-зеленые, яркосветящиеся комплексы, расположенные преимущественно в ее перинуклеарной зоне.

В результате сравнительного диагностического исследования 554 проб патологоанатомического материала, полученного от различных диких, сельскохозяйственных и домашних животных, а также людей, установлена полная корреляция результатов биопробы на мышах и на линии клеток НГУК-1. Показано, что в клетках невриномы крысы рабический

Таблица 2. Оценка чувствительности методов диагностики бешенства в культуре клеток НГУК-1 и биопробой на белых мышах

Штамм, изолят УВБ	Исходный титр вируса IgLD <sub>50</sub> /0,03 мл	Предельное разведение суспензии, в которой обнаруживается вирус		Срок выделения вируса, сут	
		белые мыши	НГУК-1 М±м, %	белые мыши	НГУК-1
CVS	3,50	1:10000	1:1000 0,3±0,1	5–6	1
Л <sub>1</sub>	1,42	1:100	1:100 1,8±0,1	14–20	2
Л <sub>2</sub>	1,14	1:100	1:10 6,0±0,5	19–23	3
Л <sub>3</sub>	1,11	1:100	1:10 2,5±0,2	15–21	3
Л <sub>4</sub>	1,23	1:100	1:10 3,0±0,1	10–18	3
Кор <sub>1</sub>	1,53	1:100	1:100 3,7±0,2	12–27	3
Кор <sub>2</sub>	2,33	1:1000	1:100 4,7±0,2	11–25	1
Кор <sub>3</sub>	1,53	1:100	1:100 3,7±0,2	12–27	3
Кош <sub>1</sub>	1,21	1:100	1:10 3,8±0,3	11–23	3
Кош <sub>2</sub>	1,83	1:100	1:100 1,7±0,3	11–14	2
Кош <sub>3</sub>	2,81	1:1000	1:100 1,7±0,3	7–14	1
Соб <sub>1</sub>	1,13	1:100	1:10 3,0±0,6	18–34	3
Соб <sub>2</sub>	1,27	1:100	1:10 3,0±0,6	15–32	3

вирус может быть выделен в более ранние сроки (через 1–3 сут. после заражения), чем при интрацеребральной инокуляции мышей (на 7–10, иногда 34 день).

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о перспективности диагностического выделения вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 и рекомендуется нами для включения в Государственный стандарт в качестве ускоренного метода лабораторной диагностики бешенства. Ускоренная диагностика бешенства в культуре клеток НГУК-1 обеспечит раннюю диагностику бешенства у животных, что, в свою очередь, снизит риск заболевания животных и людей.

### Заключение

Метод выделения вируса в культуре клеток НГУК-1 не уступает по чувствительности классической биопробе на белых мышах и имеет явные преимуще-

ства, состоящие в сокращении времени постановки диагноза (до 3 сут. в культуре клеток НГУК-1 против 30 сут. на белых мышах согласно ГОСТу) и его экономичности, так как для заражения лабораторных животных требуются особые режимные виварии, корма и обслуживающий персонал.

Метод заражения линии клеток НГУК-1 рекомендован нами для включения в ГОСТ для ускоренной диагностики бешенства и изоляции уличного рабического вируса, который следует рассматривать как возможную замену биопробы на белых мышах.

### Благодарности

*Работа частично выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Гулюкин М.И., Ведерников В.А. Ситуация уже кризисная. Ветеринарная жизнь 2008; 12: 6-8.
2. Ведерников В.А., Гулюкин М.И., Рождественский И.К. и др. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2007 году и I полугодии 2008 г. Москва; 2008.
3. Ведерников В.А., Шабейкин А.А., Гулюкин А.М. и др. Аналитический обзор мероприятий по профилактике и борьбе с бешенством животных в Российской Федерации. Департамент ветеринарии. Москва; 2014.
4. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством. Ветеринарный врач 2010; 4(17): 3-6.
5. Грибенча С.В., Львов Д.К. Рабдовирусы. В кн.: Медицинская вирусология. Москва: МИА; 2008: 586-94.
6. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика бешенства среди людей». Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 06.05.2010 г. № 54.
7. Государственный стандарт СССР. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. ГОСТ 26075-84 (СТ СЭВ 3452-81). Москва; 1984.
8. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies, 4th ed. Geneva: WHO; 1996.
9. Barrat J., Barrat M.J., Picard M. et al. Diagnostic de la rage sur culture cellulaire, comparaison des resultants de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation a la souris. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1986; 11: 207-14.
10. Webster W.A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. Can. J. Vet. Res. 1987; 51: 367-9.
11. Amano T., Rioheison E., Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clons. PNAS USA 1972; 69: 258-63.
12. Breakfield X.O. Neuroblastmitter metabolism in murine neuroblastoma cells. Life Sci. 1976; 18: 267-78.
13. Smith A.L., Tignor G.H., Emmons R.W. et al. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. Intervirology 1978; 9(6): 359-61.
14. Rudd R.G., Trimarchi C.V., Abelseth M.K. Tissue culture technique for the isolation of street strain rabies virus. J. Clin. Microbiol. 1980; 12: 590-3.
15. Rudd R.J., Trimarchi C.V. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 145-68.

16. Portnoi D., Favre S, Sureau E.P. Use of Neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of street rabies virus from field specimen. Human Services Public Health Service Center for Disease Control. USA; 1982: 35-6.
17. Авцын А.П., Кармышева В.Я., Кондакова Л.И. и др. Новая нейрогенная клеточная линия НГУК-1 и ее применение в биотехнологии и медико-биологических исследованиях. Культивирование клеток животных и человека. Тез. докл. II Всесоюз. совещ. Пущино; 1985: 75-6.
18. Татаров А.Г., Хисматуллина Н.А., Селимов М.А. и др. Выделение рабического вируса и экспресс-диагностика бешенства в культуре перевиваемых клеток невриномы Гассерова узла крысы. Вопросы вирусологии 1987; 6: 619-21.
19. Хисматуллина Н.А. Разработка и усовершенствование лабораторных методов диагностики бешенства [диссертация]. Казань; 1989.
20. Юсупов Р.Х., Хисматуллина Н.А., Селимов М.А. и др. Оценка эффективности методов выделения уличных штаммов вируса бешенства в биологических системах. Ветеринария 1989; 4: 27-9.
21. Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Селимов М.А. и др. Разработка средств и методов иммунологического мониторинга при бешенстве. Вопросы вирусологии 2001; 5: 45-8.
22. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н. и др. Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика: учебно – методическое пособие в иллюстрациях. Москва: Колос; 2010.
23. Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Янбарисова С.Р. и др. Методические указания по лабораторной диагностике бешенства. Казань; утверждены ДВ МСХ и П РФ 14.05.1997.
24. Селимов М.А., Клюева Е.В., Семенова Е.В. и др. Применение метода флуоресцирующих антител для индикации вируса бешенства на культуре клеток. В кн.: Вопросы борьбы с бешенством. Москва: Медицина; 1963.
25. Михайловский В.В. Материалы по выращиванию уличного вируса в культуре ткани [диссертация]. Москва; 1967.
26. Atanasiu P., Favre S., Collombier M. Multiplication du virus de la rage fixe sur cellules gliales en culture at apparition d'inclusions specifiques intracytoplasmiques. Application au diagnostic de la rage. C.R. Acad. Sci. 1961; 252: 2029-31.
27. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. Вопросы вирусологии 2013; 5: 38-43.

*Поступила: 10.07.2014*