

Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny wrażliwości wybranych linii komórkowych na zakażenie wirusem zapalenia tętnic koni

MAGDALENA LARSKA, JERZY ROLA

Zakład Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Larska M., Rola J.

Applying flow cytometry for evaluating selected cell lines sensitivity to equine arteritis virus infection

Summary

The purpose of the study was to attempt the application of flow cytometry to evaluate the sensitivity of various cell lines to EAV infections, according to their type and passage number. Monolayers of RK13, Vero, BHK-21 and MDBK cells were infected with reference EAV strain Bucyrus. First of all the susceptibility of each cell line to different titers of the virus was tested. The second step was to establish a time course kinetic of viral infection. Sequentially, starting from 2 to 72 hours post infection the cells were fixed, permeabilized and stained with FITC monoclonal EAV-specific antibodies. The analysis carried out in Coulter Epics XL (Beckman Coulter) flow cytometer considered the percentage of EAV infected cells determined in a time range by gating FITC/Count histograms. Significant differences in the sensitivity to EAV infection in particular cell lines were found. After 24 h. p.i. most RK13 cells infected with Bucyrus strain showed signs of infection in the titer of 10 TCID₅₀, whilst in Vero and BHK-21 a similar histogram was not obtained until 100 and 1000 TCID₅₀ respectively. As early as 10 and 12 h post inoculation significant level of infected cells (37.9 and 18.6%) were detected in line RK13 passage 36 and 11 respectively. Cell line Vero passage 115 indicated a higher sensitivity to EAV infection comparing to Vero passage 153. More than 70% of cells from that line were EAV infected after 24 hours post inoculation. In Vero passage 153 the infected cells (15.4%) were not detected until 36 h.p.i. The presence of infected cells was found also after 36 h post inoculation in BHK-21 cell line passage 10. The obtained results indicate that differences in cell line susceptibility to EAV infection depend on their type and decrease with their passage.

Keywords: equine arteritis virus, cell line

Wirus zapalenia tętnic koni (EAV – equine arteritis virus) należy do rodziny *Arteriviridae*, rzędu *Nidovirales*. Wirus ten jest szeroko rozpowszechniony w populacji koni na całym świecie i powoduje poważne straty ekonomiczne w ich hodowli. W warunkach naturalnych głównym rezerwuarem wirusa są ogiery, które po przechorowaniu stają się często nosicielami i siewcami EAV z nasieniem. Identyfikacja ogierów siewców wirusa oparta jest na próbie izolacji EAV z nasienia w hodowli komórkowej (test zalecany przez O.I.E.). Na zakażenie EAV *in vitro* wrażliwe są komórki pierwotnych hodowli makrofagów, wywodzące się z nerek, płuc oraz jajnika. Spośród linii komórkowych ciągłych do izolacji wirusa używa się najczęściej hodowli komórkowej nerki królika (RK13). Ponadto na zakażenie EAV wrażliwe są hodowle komórkowe z nerki nowo narodzonych chomików syryjskich (BHK-21) oraz nerki afrykańskiej małpy zielonej (Vero). Wynik testu izolacji zależy, między innymi, od

jakości próbki nasienia nadesłanej do laboratorium, a także od wrażliwości użytej do izolacji hodowli komórkowej. Na wrażliwość komórek wpływ może mieć zarówno typ, jak i wysokość pasażu hodowli.

Cytometria przepływowa służy do precyzyjnej oceny ilościowej i jakościowej pojedynczych komórek. Polega na pomiarze pojedynczych komórek lub cząstek przepływających przez cytometr w strumieniu cieczy oraz na zjawisku fluorescencji barwników związanych z przeciwciałami. Przy użyciu cytometrii przepływowej można m.in. badać cechy morfometryczne testowanych obiektów na podstawie ugięcia światła na brzegach komórek (rozproszenie czołowe światła, Forward Scatter, FSC), cechy morfologiczne struktur wewnątrzkomórkowych (ziarnistość) na podstawie rozproszenia światła na organelach wewnątrzkomórkowych i błonie komórkowej (rozproszenie boczne światła, Side Scatter, SSC). Dzięki możliwości rejestracji fluorescencji o różnej długości fali w różnych

kanałach, w obecnie stosowanych cytometrach można badać nawet 17-18 cech komórek jednocześnie (BD LSR II System, BD Biosciences) (10). Analiza cytometryczna znalazła zastosowanie głównie w diagnostyce klinicznej dzięki możliwości immunofenotypowania komórek krwi. Metoda ta pozwala również na monitorowanie cech morfologicznych komórek, oznaczanie ilości kwasów nukleinowych, bezpośrednią identyfikację mikroorganizmów i diagnostykę serologiczną. Tradycyjne metody badań wirusologicznych są pracochłonne i nie zawsze precyzyjne. Cytometria przepływowa pozwala na szybką, specyficzną i ilościową ocenę procesów takich, jak zakażenie. W ostatnich latach wzrosło znaczenie tej techniki w badaniach wirusologicznych (2, 8).

Celem badań była próba zastosowania cytometrii przepływowej do oceny wrażliwości wybranych linii komórkowych na zakażenie EAV w zależności od typu i wielkości pasażu hodowli.

Materiał i metody

Linie komórkowe. Do badań użyto hodowli komórkowych wrażliwych na zakażenie EAV, tj. hodowli komórek nerki królika (rabbit kidney RK13, ATCC CCL37) pasaż 11, 36 i 78, nerki małpy zielonej (Vero) pasaż 115 i 153 oraz nerki nowo narodzonych chomików syryjskich (baby hamster kidney, BHK-21, ATCC CCL10) pasaż 10 i 60. Jako kontroli użyto hodowli komórek nerki bydłowej MDBK (ATCC CCL-22) pasaż 83, która nie jest wrażliwa na zakażenie EAV. Komórki linii RK13, Vero oraz MDBK namnażano w płynie wzrostowym MEM Eagle'a (Sigma) z 10% dodatkiem bydłowej surowicy płodowej (FBS, Gibco). Hodowlę BHK-21 zakładano w płynie Glasgow MEM (Sigma) z dodatkiem L-glutaminy, aminokwasów (Gibco), tryptozy (Sigma), antybiotyków (Sigma) i 10% FBS. Wszystkie hodowle komórkowe inkubowano w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Adaptacja wirusa do hodowli i jego mianowanie. Do zakażenia hodowli komórkowych (RK13, Vero i BHK-21) użyto szczepu referencyjnego EAV Bucyrus. Wirusem zakażano poszczególne hodowle założone w butelkach o powierzchni 75 cm². Hodowle z wirusem inkubowano i po wystąpieniu efektu cytopatycznego w 100% zamrażano w -70°C. Wykonywano po 2-3 pasażach i następnie miano wano wirusa określając TCID₅₀.

Przygotowanie komórek do badania cytometrycznego. Ustalanie wrażliwości komórek na zakażenie EAV. Jednodniowe, jednowarstwowe hodowle komórkowe RK13 (pasaż 11), Vero (pasaż 115) i BHK-21 (pasaż 10) w butelkach o powierzchni 25 cm² zakażano przez adsorpcję 10-krotnie wzrastającymi dawkami (od 1 do 10⁵ TCID₅₀) wirusa Bucyrus, adaptowanego do danej linii. Hodowle inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂ przez 24 godz., a następnie komórki trypsynizowano i utrwalano.

Ustalanie wrażliwości komórek na zakażenie wirusem w zależności od czasu inkubacji. Jednodniowe, jednowarstwowe hodowle komórkowe RK13 (pasaż 11, 36 i 78), Vero (pasaż 115 i 153), BHK-21 (pasaż 10 i 60)

i MDBK (pasaż 83) w butelkach o powierzchni 25 cm² zakażano przez adsorpcję wirusem Bucyrus w dawce 10³ TCID₅₀, adaptowanym do danej linii. Hodowle inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂ przez czas od 2 do 72 godz., a następnie komórki trypsynizowano i zbierano do czystych probówek o pojemności 15 ml (Falcon). Płyn z hodowli zbierano również. Zawiesinę komórek wirowano przy 500 × g przez 10 min.

Utrwalanie komórek. Komórki z osadu zawieszano w 5 ml PBS i wirowano przy 500 × g przez 10 min. Supernatant usuwano, komórki ponownie zawieszano w 1 ml PBS, a następnie dodawano 1 ml 4% roztworu paraformaldehydu (Sigma) (5). Komórki inkubowano w temp. 4°C przez 15 min. i przepłukiwano jednokrotnie w PBS. Osad zawieszano w 1 ml PBS i przenoszono do 70% etanolu schłodzonego do 4°C (9). Komórki w etanolu przechowywano w temp. -20°C do czasu badań.

Znakowanie komórek. W badaniach cytometrycznych zastosowano metodę immunofluorescencji bezpośredniej, do której użyto przeciwciał monoklonalnych dla EAV znakowanych fluoresceiną (FITC, BioX) o wcześniej ustalonym rozcieńczeniu 1 : 100. Inkubację z przeciwciałami FITC przeprowadzano w 37°C przez 1 godz., a następnie komórki płukano 3-krotnie i zawieszano w PBS. Komórki obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym i sporządzono dokumentację fotograficzną.

Pomiar cytometryczny. Pomiar fluorescencji badanych komórek wykonano w cytometrze przepływowym Coulter Epics XL (Beckman Coulter). Komórki analizowano przy użyciu oprogramowania System II v. 3.0. Protokół zawierał 3 wykresy obrazujące:

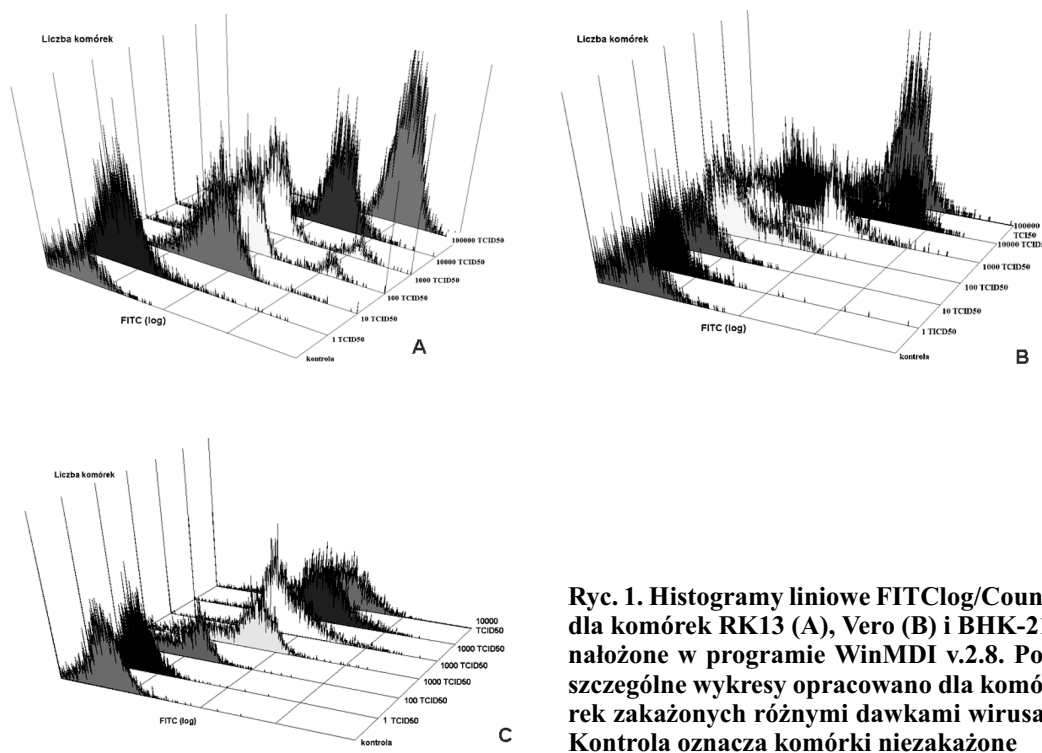
- wykres punktowy FS/SS – (forward scatter/side scatter) stosunek wielkości do ziarnistości komórek,
- histogram FITClog/Count – natężenie fluorescencji w skali logarytmicznej do liczby komórek,
- wykres punktowy FITClog/FS – intensywność fluorescencji w skali logarytmicznej do wielkości komórek,
- wykres punktowy FITClog/SS – intensywność fluorescencji w skali logarytmicznej do ziarnistości komórek.

Przepływ komórek przez cytometr ustawiono na poziomie 300 obiektów na sekundę. W analizie brano pod uwagę 50 000 komórek. Jako kontroli użyto komórek niezakażonych przygotowanych do analizy analogicznie, jak komórki zakażone EAV.

Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu WinMDI v.2.8.

Wyniki i omówienie

Wrażliwość komórek na zakażenie EAV określano na podstawie najmniejszej dawki szczepu referencyjnego Bucyrus wywołującej w badanej hodowli komórkowej zakażenie po 24 godzinach od inokulacji oraz na podstawie czasu od inokulacji komórek wirusem do wykrycia antygeny EAV w komórkach. Ustalanie dawki zakaźnej dla komórek hodowli RK13, Vero i BHK-21 przedstawiają histogramy na ryc. 1. Najwyższą wrażliwością na zakażenie EAV charakteryzowały się komórki RK13. Stwierdzono, że komórki tej linii zakażone dawką wirusa Bucyrus równą 10 TCID₅₀

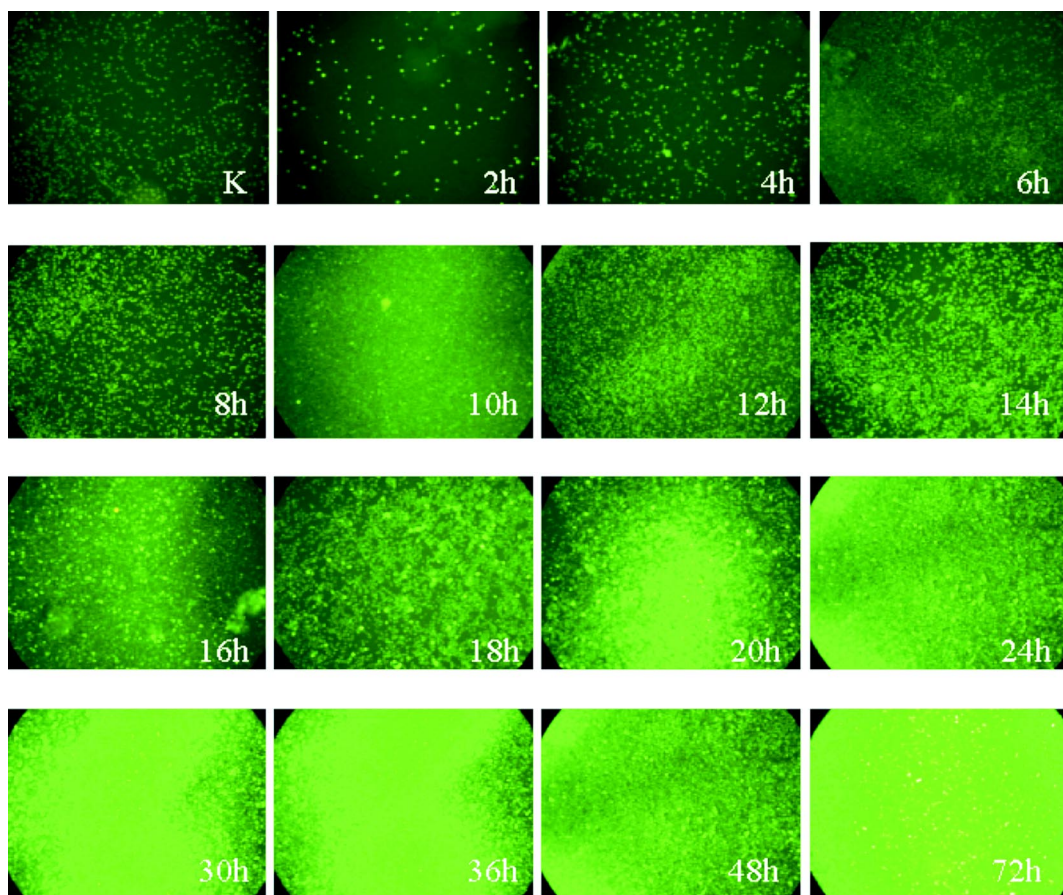


Ryc. 1. Histogramy liniowe FITClog/Count dla komórek RK13 (A), Vero (B) i BHK-21 nałożone w programie WinMDI v.2.8. Poszczególne wykresy opracowano dla komórek zakażonych różnymi dawkami wirusa. Kontrola oznacza komórki niezakażone

kowych w czasie począwszy od 2 do 72 godz. po zakażeniu. Komórki przed analizą cytometryczną obserwowano pod mikroskopem i wykonano dokumentację fotograficzną. Wyniki badania mikroskopowego były porównywalne do wyników badań cytometrycznych. Stwierdzono, że liczba fluorescujących komórek rosła wraz z upływem czasu od zakażenia (ryc. 2). Następnie zawiesiny komórek poddano badaniu w cytometrze przepływowym. Wybrane wyniki przedstawiono w formie histogramów liniowych zestawionych w programie WinMDI v. 2.8 na ryc. 3. Odsetek

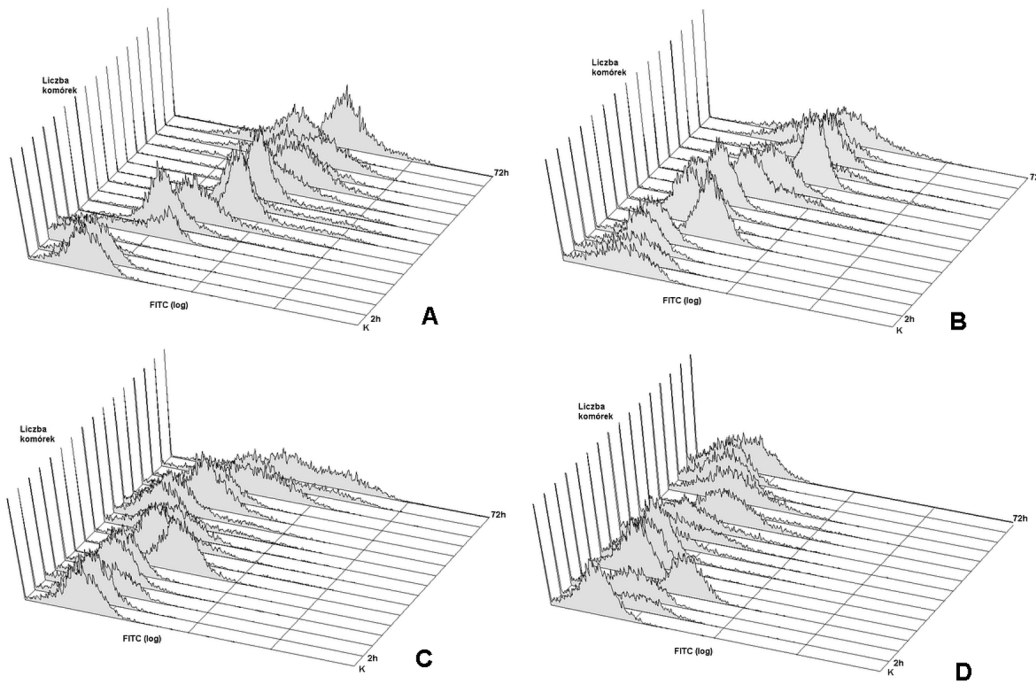
wyróżniały się większą intensywnością fluorescencji od komórek zakażonych mniejszą dawką wirusa oraz od komórek kontrolnych. Świadczy to o tym, że większość komórek RK13 uległa zakażeniu już przy tej dawce wirusa. W hodowli Vero wyraźna zmiana fluorescencji widoczna w histogramie nastąpiła przy dawce wirusa 100 TCID₅₀, natomiast w hodowli BHK-21 dopiero dawka 1000 TCID₅₀ wywołała zakażenie. Dodatkowo histogramy komórek Vero zakażonych dawką 10³ i 10⁴ TCID₅₀ przedstawiają dwie oddzielne populacje komórek – zakażonych (ok. 50%) i nie zakażonych (ok. 50%) wirusem, czego nie zaobserwowano w przypadku RK13 i BHK-21. W tych liniach zaobserwowano wzrost fluorescencji badanych obiektów i przesuwanie się wykresu FITClog/Count w prawą stronę.

komórek zakażonych wirusem referencyjnym Bucyrus w dawce 10³TCID₅₀ (przy analizie cytometrycznej 5000 komórek z każdej próbki) w miarę upływu czasu

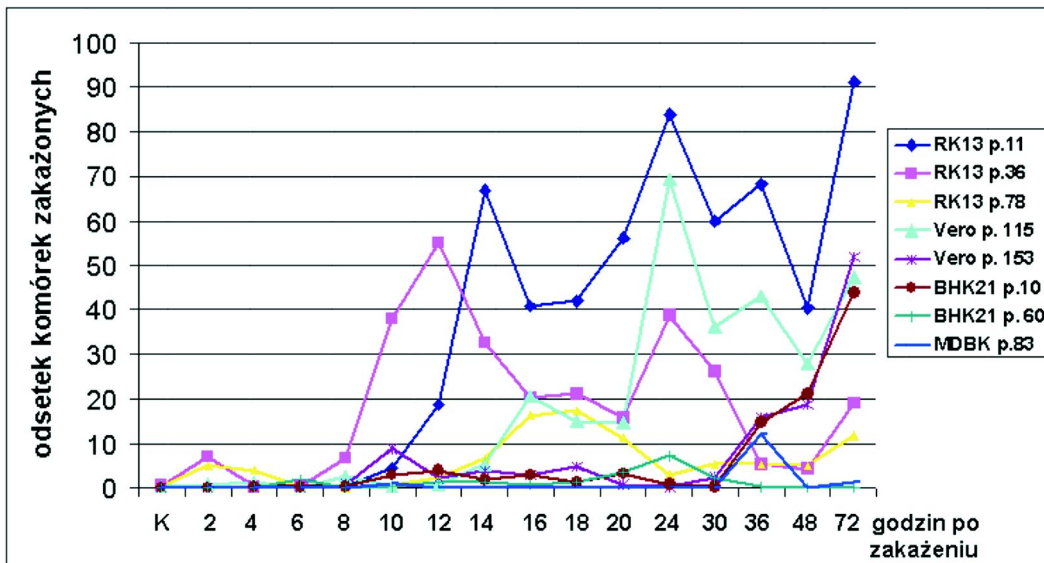


Ryc. 2. Obraz mikroskopowy komórek hodowli RK13 pasaż 11 zakażonych wirusem referencyjnym Bucyrus od 2. do 72. godziny po zakażeniu. Literą K oznaczono kontrolę, którą stanowiły komórki niezakażone

W kolejnym etapie badań określono przebieg zakażenia EAV w różnych hodowlach komór-



Ryc. 3. Histogramy liniowe FITClog/Count dla komórek RK13 pasaż 11 (A), Vero pasaż 115 (B), BHK-21 pasaż 10 (C) i MDBK pasaż 83 (D) nałożone w programie WinMDI v.2.8. Poszczególne wykresy opracowano dla kolejnych czasów inkubacji (2-72 godz.) komórek z wirusem Bucyrus o mianie 10^3 TCID₅₀. Literami K zaznaczono histogramy dla komórek niezakażonych



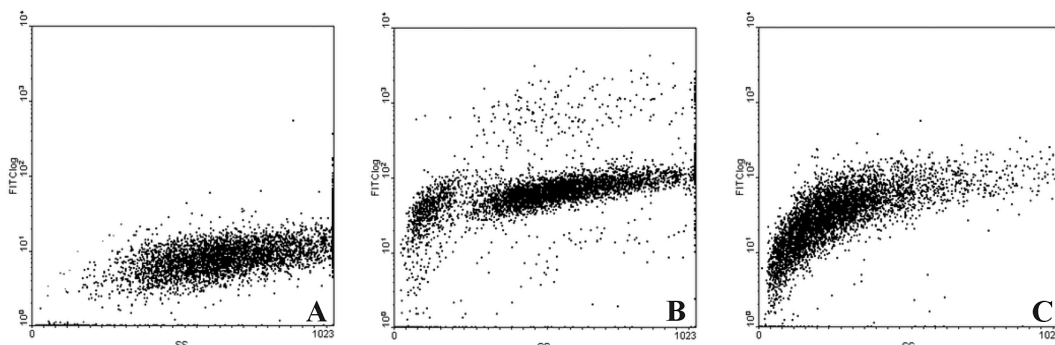
Ryc. 4. Odsetek komórek różnych hodowli o różnej wysokości pasażu zakażonych wirusem EAV w stosunku do czasu inkubacji

po zakażeniu przedstawiono na ryc. 4. Dawkę wirusa do doświadczenia wybrano biorąc pod uwagę ustaloną wcześniej najmniejszą dawkę wirusa wywołującą zakażenie po 24 godz. we wszystkich użytych hodowlach komórkowych. Odsetek komórek zakażonych ustalono po wybrankowaniu komórek w histogramach FITClog/Count (3, 11).

Zaobserwowano znaczne różnice we wrażliwości na zakażenie EAV poszczególnych hodowli. Najszybciej zakażone komórki wykryto w hodowli RK13 o pasażu 36. W hodowli tej po 8 godz. od inokulacji 6,76%, a po 10 godz. aż 37,9% komórek było zakażonych.

Odsetek ten rósł, osiągając wartość 55%, a następnie zaczął stopniowo spadać, osiągając wartość 19,1%, odpowiednio, po 12 i 72 godz. od zakażenia. Wśród komórek RK13 o pasażu 11 zaobserwowano bardzo dynamiczny wzrost odsetka zakażonych komórek od 12 godz. po zakażeniu. Po 72 godz. od inokulacji 91,3% komórek było zakażonych wirusem. Większą wrażliwość na zakażenie EAV wykazała hodowla Vero o pasażu 115 niż Vero o pasażu 153. W pierwszej hodowli 5,48% komórek uległo zakażeniu po 14 godz. od inokulacji. Dobę po zakażeniu prawie 70% komórek tej hodowli było zakażonych EAV. W hodowli Vero o pasażu 153 obecność komórek zakażonych wirusem (15,7%) stwierdzono dopiero po 36 godz. od zakażenia. Z kolei w hodowli BHK-21 pasaż 10 obecność zakażonych komórek stwierdzono dopiero po 36 godz. od zakażenia hodowli o pasażu 10, zaś w BHK-21 pasaż 60 jedynie 7,15% zakażonych komórek stwierdzono w 24 godz. po zakażeniu EAV. W hodowli MDBK, która stanowiła kontrolę ujemną w badaniach, nie stwierdzono zakażenia EAV.

Odsetek zakażonych komórek w badanych hodowlach komórkowych nie rósł liniowo w miarę upływu czasu od zakażenia, ze względu na fakt, iż EAV wywołuje efekt cytotacyjny w zakażonych komórkach. Polega on na zmianie kształtu komórki, zmianach degeneracyjnych jądra komórkowego, pojawianiu się wrętów wewnątrzjądrowych i wewnątrzcytoplazmatycznych, wakuolizacji komórek i ostatecznym ich rozpadzie. Na wykresach liniowych oraz punktowych FITClog/SS w hodowlach komórkowych w większości badanych hodowli zaobserwowano pojawianie się populacji komórek o niskiej wartości fluorescencji oraz



Ryc. 5. Wykresy punktowe (dotplot) zależności fluorescencji (FITC) i ziarnistości komórek (SS) hodowli Vero pasaż 115: A – 10 godz., B – 24 godz. i C – 72 h po zakażeniu EAV

o małej ziarnistości (SS) (ryc. 5). Obecność tej populacji związana była prawdopodobnie nie tylko z fragmentacją komórek wywołaną efektem cytotatycznym, ale również przez niezależne lub zależne od zakażenia EAV zmiany apoptotyczne i nekrotyczne komórek (6). Tym można wyjaśnić spadek fluorescencji w większości hodowli po 24 godzinach od inokulacji. Spadek ten częściej występował w hodowlach o wyższym pasażu, czyli zależał prawdopodobnie od wieku komórek. Badania Archambault i St-Laurenta (1) wykazały, że EAV indukuje apoptozę zakażonych komórek. Komórki apoptotyczne w hodowli Vero pojawiały się po 24 godz. od zakażenia hodowli zjadliwym szczepem terenowym w dawce 0,1 TCID₅₀/dołek, wraz ze zmianami cytotatycznymi.

Wraz z czasem, który upłynął od zakażenia wzrastała również liczba wirusa zewnątrzkomórkowego, który ze względu na wielkość nie może być bezpośrednio wykryty przez cytometr. Maess i wsp. (4) stwierdzili, że po 30 godzinach od inokulacji komórek BHK-21 przez EAV wartość TCID₅₀ wirusa zewnątrzkomórkowego może być prawie 100-krotnie większa niż wirusa wewnątrzkomórkowego. Badacze ci obserwowali wystąpienie zakażenia w komórkach linii BHK-21 po 12 godz. od ich zakażenia szczepem Bucyrus o mianie 300 TCID₅₀. W innych badaniach Wada i wsp. (12) wykazali obecność antygenów wirusowych po 8 godz. po infekcji komórek BHK-21 wirusem Bucyrus. W badaniach tych najwyższe miano wirusa utrzymywało się do 40 godz., a następnie zaczęło stopniowo spadać. Wyniki wymienionych badań są porównywalne do prezentowanych rezultatów.

Moore i wsp. (6) stwierdzili również, że wrażliwość komórek na zakażenie EAV zależna jest nie tylko od ich typu, ale również od patogenności szczepu wirusowego. Na podstawie analizy cytometrycznej autorzy stwierdzili, że w komórkach RK13 (pasaż 5-15) znacząca część komórek zostaje zakażona po 12 godzinach od inokulacji szczepem silnie zjadliwym i o średniej zjadliwości, natomiast po zakażeniu szczepem mało zjadliwym niewielka. Mało wrażliwa na zakażenie okazała się linia pierwotna komórek nabłonkowych tętnicy płucnej końskiej (ECs), w której EAV wykryto

po 24 godz. od zakażenia, a obecność szczepu o małej wirulencji w komórkach ECs stwierdzono dopiero po 36 godz. od inokulacji. Jednocześnie linia ECs okazała się odpowiednia do oceny patogenności i zjadliwości izolatów EAV *in vitro* (7).

Podsumowując, wrażliwość badanych linii komórkowych na zakażenie

EAV zależała od rodzaju i wysokości pasażu hodowli. Najwyższą wrażliwość na zakażenie EAV wykazały komórki hodowli RK13 oraz Vero o niskim pasażu. Najmniej wrażliwa na zakażenie EAV wśród badanych hodowli okazała się linia BHK-21. Przedstawione badania wskazują również, że cytometria przepływowa jest szybką i wiarygodną metodą diagnostyczną i może być zastosowana do badania kinetyki zakażenia EAV oraz zmian apoptotycznych i nekrotycznych (1).

Piśmiennictwo

1. Archambault D., St-Laurent G.: Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes* 2000, 20, 143-147.
2. Bordignon J., Pires Ferreira S. C., Medeiros Caporale G. M., Carrieri M. L., Kotait I., Lima H. C., Zanetti C. R.: Flow Cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J. Virol. Meth.* 2002, 105, 181-186.
3. Kao C. L., Wu M. C., Chiu Y. H., Lin J. L., Wu Y. C., Yueh Y. Y., Chen L. K., Shiao M. F., King C. C.: Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3672-3677.
4. Maess J., Reczko E., Böhm H. O.: Das Pferdearteriitisvirus (Equine Arteritis Virus): Seine Vermehrung in BHK 21-Zellen, die Bestimmung der Flotationsdichte und die elektronenoptische Darstellung. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 1970, 30, 47-58.
5. McSharry J. J.: Uses of flow cytometry in virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994, 7, 576-604.
6. Moore B. D., Balasuriya U. B. R., Hedges J. F., MacLachlan N. J.: Growth characteristics of a highly virulent, a moderately virulent and an avirulent strain of equine arteritis virus in primary endothelial cells as predictive of their virulence to horses. *Virology* 2002, 298, 39-44.
7. Moore B. D., Balasuriya U. B., Nurton J. P., McCollum W. H., Timoney P. J., Guthrie A. J., MacLachlan N. J.: Differentiation of strains of equine arteritis virus of differing virulence to horses by growth in equine endothelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 2003, 64, 779-784.
8. Pellicciari C., Mangiarotti R., Bottone M. G., Danova M., Wang E.: Identification of resting cells by dual-parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry* 1995, 21, 329-337.
9. Peretto S. P., Chattopadhyay P. K., Roederer M.: Seventeen-Color Flow Cytometry: Unraveling the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4, 648-655.
10. Qin Q. W., Gin K. Y., Lee L. Y., Gedaria A. I., Zhang S.: Development of a flow cytometry based method for rapid and sensitive detection of a novel marine fish iridovirus in cell culture. *J. Virol. Meth.* 2005, 125, 49-54.
11. Schimenti K. J., Jacobberger J. W.: Fixation of mammalian cells for flow cytometric evaluation of DNA content and nuclear immunofluorescence. *Cytometry* 1992, 13, 48-59.
12. Wada R., Fukunaga Y., Kondo T., Kanemaru T.: Ultrastructure immunocytochemistry of BHK-21 cells infected with a modified Bucyrus strain of equine arteritis virus. *Arch. Virol.* 1995, 140, 1173-1180.