



Tollwutvirusnachweis in Zellkulturen als Alternative zum Test an Mäusen

R.Zanoni, B.Hörnlimann, A.I.Wandeler, A.Kappeler,
R.Kipfer und E.Peterhans

Institut für Veterinär-Virologie
Länggasstr. 122, CH-3012 Bern

Zusammenfassung

Die Tollwut ist aus grossen Teilen der Schweiz verschwunden. Trotzdem kommt es gelegentlich noch zu einer ernsthaften Exposition von Menschen durch tollwütige oder tollwutverdächtige Tiere. Wenn solche Tiere zur Untersuchung gelangen, kann die Tollwutdiagnose mit einer sehr spezifischen und empfindlichen direkten Immunfluoreszenz in Hirnabklatschpräparaten gestellt werden. Negative Resultate werden gemäss WHO-Empfehlung mittels intracerebraler Inokulation von Hirnmaterial in dreiwöchige Mäuse abgesichert. Diese Methode weist eine hervorragende Empfindlichkeit auf und kann falsch negative Immunfluoreszenz-Resultate aufdecken, die allerdings nur in einem sehr geringen Prozentsatz (bei uns 0.043%) vorkommen. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt im relativ hohen jährlichen Bedarf an Versuchstieren und in der langen Verzögerung bis eine Diagnose gestellt werden kann: 7-20 Tage bei positivem, 21 Tage bei negativem Befund.

Die Kultivierung von Hirnmaterial auf einer Maus-Neuroblastoma Zell-Linie stellt eine verlockende Alternative zum Mäuseinokulationstest dar. Diese Methode liefert in der Regel innert wenigen Tagen eine abschliessende Diagnose. Erste Versuche mit dem Zellkulturtest zeigen nebst einer in unserem Labor noch ungenügenden Sensitivität (80.7%) die Notwendigkeit auf, die Reproduzierbarkeit dieses Tests jederzeit mit strengen Kontrollen zu überprüfen. Weitere Verfeinerungen des Verfahrens und ein sorgfältiger Langzeitvergleich mit dem Mäuseinokulationstest werden notwendig sein, bevor an eine Ablösung des Mäuseinokulationstestes durch den Zellkulturtest gedacht werden kann.

Summary: Rabies Tissue Culture Infection Test as an Alternative for the Mouse Inoculation Test

Rabies has disappeared from large parts of Switzerland. Due to systematic oral fox-vaccination campaigns that started in 1978, cases of rabies in wild and domestic animals have been confined to the western frontier with



France in the last three years. Nevertheless, some cases of severe exposition of man by rabid or rabies-suspect animals still occur. Rabies can be diagnosed in brain smears of infected animals with high specificity and sensitivity by a direct immunofluorescence method. According to WHO recommendations, negative results are to be confirmed in cases of a human exposition by intracerebral inoculation of brain suspensions in three-week-old mice. This method has an excellent sensitivity and is able to detect false-negative results in immunofluorescence, which occur in a very small percentage (0.043%). The disadvantage of this confirmatory assay is the sacrifice of relatively high numbers of mice (in the Swiss rabies centre about 1'300 animals each year), and the long time required for a final diagnosis: 7-20 days in positive, 21 days in negative cases.

The cultivation of virus from brain suspensions on a mouse neuroblastoma cell line is a tempting alternative to the mouse inoculation test. This method usually provides a conclusive diagnosis within a few days. However, in our hands it showed in preliminary experiments an unsatisfactory sensitivity (80.7%). The necessity to carry out strict reproducibility controls in this assay has to be emphasized. Further work must be invested in the improvement of the rabies tissue culture infection test and a careful long-term comparison with the mouse inoculation test will be necessary before the mouse inoculation test can be replaced.

Einleitung

Die Tollwut ist eine von Tieren auf den Menschen übertragbare, tödlich verlaufende Viruserkrankung des zentralen Nervensystems, die seit dem Altertum bekannt ist. Der älteste heute bekannte Hinweis auf Tollwut stammt aus Mesopotamien und datiert aus dem 23. Jahrhundert vor Christus. Schon damals wurde der Hund als der für den Menschen gefährlichste Verbreiter der Tollwut erkannt. Gemäss WHO-Statistiken sterben jährlich mehr als 30'000 Menschen an Tollwut. Über 99% dieser Fälle werden in den tropischen Breitengraden (Asien, Afrika, Südamerika) als Folge von Bissen durch tollwütige Hunde registriert. Die Übertragung von Tollwut von einem infizierten Tier auf den Menschen geschieht fast ausschliesslich durch Biss. Erst seit Louis Pasteur Ende des letzten Jahrhunderts besteht die Möglichkeit, Menschen durch Impfung vor oder nach einer Exposition vor der Tollwut zu schützen. Nach einer Exposition muss möglichst rasch - d.h. innerhalb von wenigen Tagen - mit passiver (Hyperimmunserum) und aktiver



Immunisierung (inaktiviertes Tollwutvirus) begonnen werden. Diese Behandlung erstreckt sich über mehrere Wochen. Bei uns ist sie heute dank modernen Impfstoffen praktisch ohne Nebenwirkungen. In diesem Zusammenhang ist eine rasche und zuverlässige Diagnose von verdächtigen Tieren als mögliche Kontaminationsquellen äusserst wichtig. Bei einer klinisch manifesten Tollwuterkrankung kommt nach wie vor jede Behandlung zu spät.

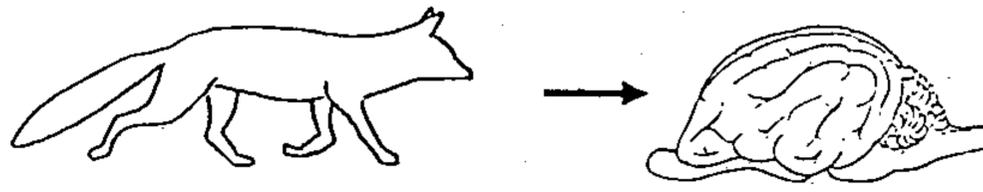
Während des 2. Weltkrieges nahm in Osteuropa ein sylvatischer Tollwutseuchenzug mit dem Fuchs als Hauptverbreiter und Hauptopfer seinen Ursprung, der inzwischen weite Teile Ost- und Westeuropas erreicht hat und erst im mittleren Frankreich und nördlichen Italien zum Stillstand gekommen ist. Es ist primär der strikten Impfung der Hunde in weiten Teilen Europas und somit der Verhinderung der Übertragung der Fuchstollwut auf den Hund mit Etablierung eines unabhängigen urbanen Zyklus zu verdanken, dass dieser Seuchenzug in Europa nur verhältnismässig wenige Opfer beim Menschen gefordert hat. In der Schweiz, die im Frühjahr 1967 von diesem Seuchenzug erreicht wurde, kam es im Jahr 1977 zu 3 Todesfällen. Seit 1978 werden in der Schweiz regelmässig auch Füchse gegen Tollwut geimpft, was zur komfortablen Situation geführt hat, dass heute Tollwutfälle beim Wild- und Haustier praktisch nur noch an der westlichen Grenze zu Frankreich vorkommen. Die Möglichkeit, dass Menschen durch tollwütige oder tollwutverdächtige Tiere exponiert werden, ist aber nach wie vor gegeben. Eine zuverlässige Tollwutdiagnostik hilft gerade bei einer solch geringen Ausdehnung der Gebiete mit Tollwutfällen wie in der Schweiz mit, durch unnötige postexpositionelle Behandlungen entstehende Kosten niedrig zu halten.

Tollwutdiagnose

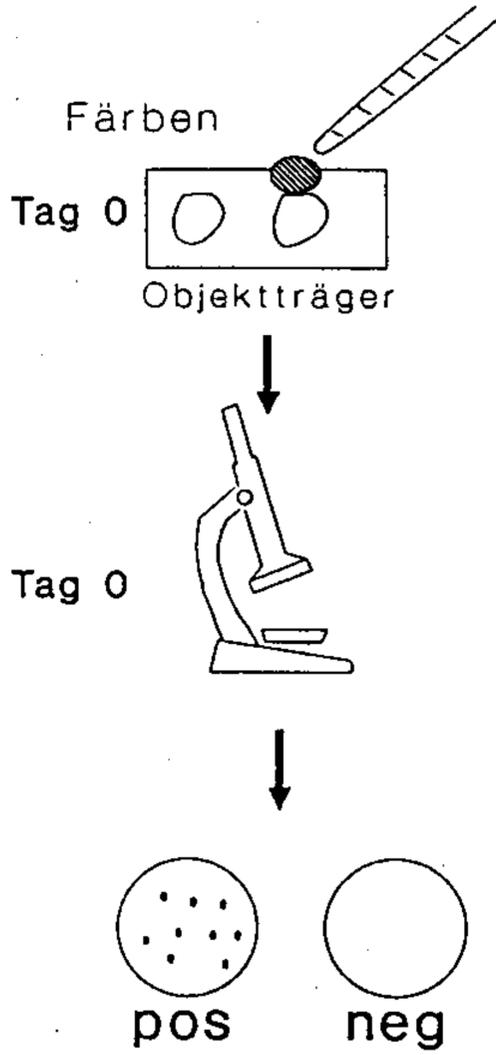
Die direkte Immunfluoreszenz in Hirnabklatschpräparaten (2) ist wegen ihrer hohen Spezifität und beispielhaften Sensitivität die Methode der Wahl für den Nachweis einer Tollwutinfektion. Ein gegen das Nukleokapsid (innere Struktur) des Tollwutvirus gerichteter, mit Fluorescein-Iso-Thiocyanat (FITC) konjugierter polyklonaler Antikörper dient in diesem Verfahren der spezifischen Erkennung und Fluoreszenzmarkierung von Tollwuteinschlusskörperchen in infizierten Neuronen (Fig. 1).

Fig. 1

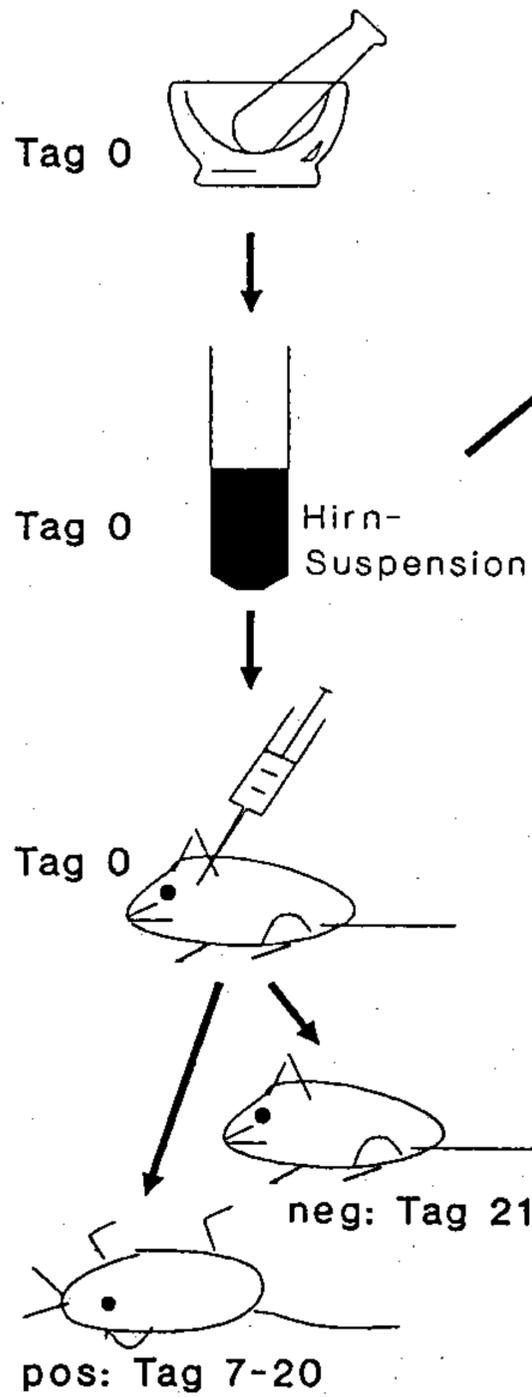
NACHWEIS DES TOLLWUTVIRUS



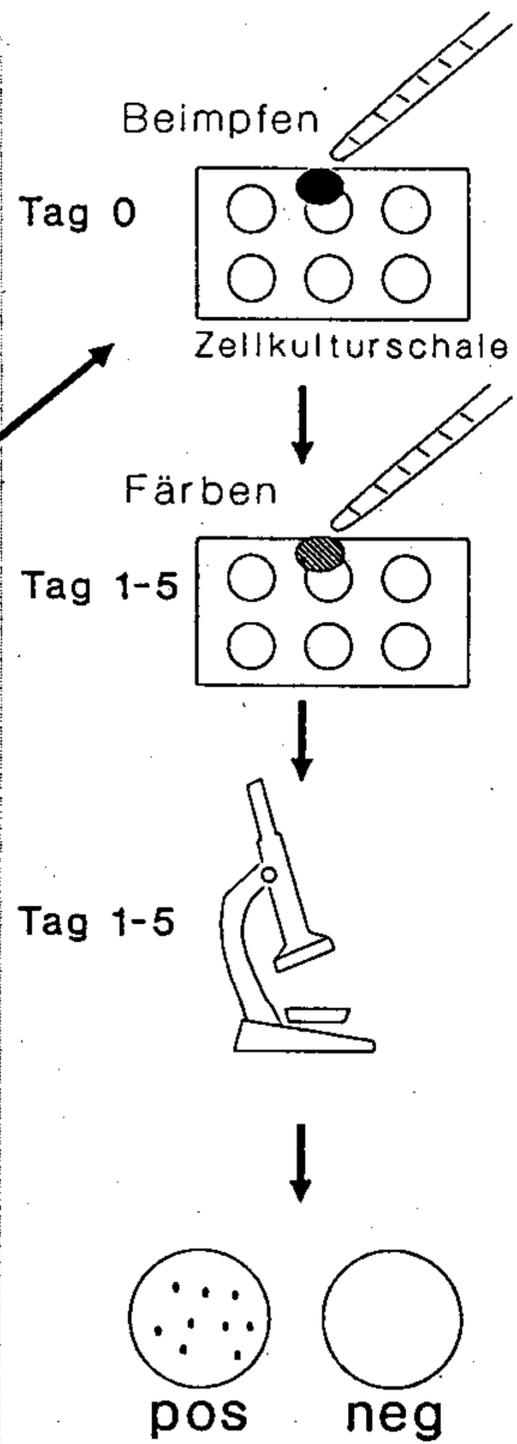
IMMUNFLUORESZENZ



MÄUSEINOKULATIONS- TEST



ZELLKULTURTEST





Gemäss WHO-Empfehlung (10) soll die Immunfluoreszenz-Diagnose in Fällen von ernsthafter Exposition*) eines Menschen durch ein untersuchtes Tier mit einem zweiten, noch sensitiveren Verfahren abgestützt werden, um die Möglichkeit eines falsch-negativen Resultates auf ein absolutes Minimum zu reduzieren. Klassischerweise wird dafür die intracerebrale Inokulation von fünf dreiwöchigen Mäusen mit einer Suspension des fraglichen Hirnmaterials herangezogen (4). Dieses Verfahren ist äusserst empfindlich und beseitigt im negativen Fall (keine Maus an Tollwut gestorben) jeden Zweifel an einer stattgehabten Tollwutexposition. In mehr als 20'000 in den letzten 12 Jahren in der schweizerischen Tollwutzentrale im Mäuseinokulationstest überprüften Fällen wurden lediglich 10 falsch-negative Immunfluoreszenz-Diagnosen (0.043%) festgestellt. Diese Auswertung zeigt die enorme Treffsicherheit der direkten Immunfluoreszenz auf, deutet aber doch auch auf die Berechtigung der WHO-Empfehlung hin. Der Mäuseinokulationstest hat allerdings zwei schwerwiegende Nachteile: Einerseits führt er im Moment an der schweizerischen Tollwutzentrale dazu, dass jährlich rund 1'300 Mäuse geopfert werden müssen (Stand 1989; 1980: 16'000 Tiere); andererseits muss in diesem Test mit einer Inkubationszeit von 7-20 Tagen gerechnet werden, was zu einer entsprechenden Verzögerung der abschliessenden Diagnose führt.

Alternative zum Mäuseinokulationstest

Die genannten Nachteile des Mäuseinokulationstestes führten schon vor einigen Jahren zu ersten Versuchen, anstelle von Mäusen für die Überprüfung von negativen Immunfluoreszenz-Resultaten Zellkulturen zu verwenden (5,6). Die wichtigste von einem solchen alternativen System zu erfüllende Voraussetzung ist eine mit dem Tierversuch vergleichbare Sensitivität. Diese Forderung konnte erst erfüllt werden, als die anfänglich verwendete BHK-21 (Baby Hamster Kidney) Zell-Linie durch eine Maus-Neuroblastoma Zell-Linie ersetzt wurde. Die erhöhte Empfänglichkeit der Neuroblastomazellen, die ursprünglich aus einem Nervenzellentumor einer Maus gewon-

*) Als ernsthafte Expositionen gelten Bisse, Kratzverletzungen, Kontakt von Speichel mit offenen Wunden oder Schleimhäuten und unkontrollierter Kontakt von Kindern mit verdächtigen Tieren

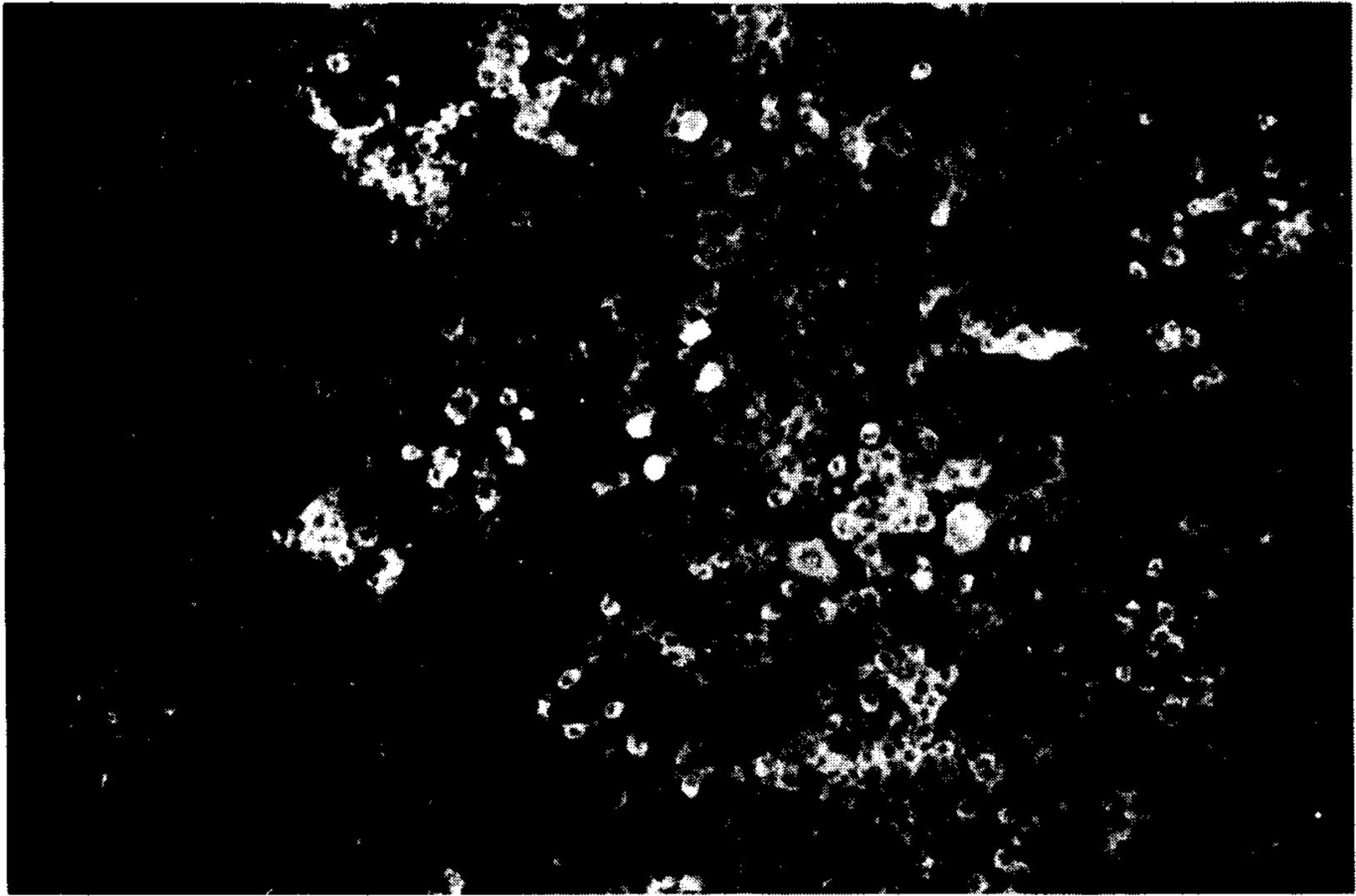


Fig. 2: Tollwutvirusnachweis in Neuroblastomazellen mittels Immunfluoreszenz.

nen wurden, erklärt sich aus der Tatsache, dass das Tollwutvirus eine sehr ausgeprägte Vorliebe für Nervengewebe besitzt. Der verfeinerte Zellkulturtest mit Neuroblastomazellen hat inzwischen bereits in verschiedenen Laboratorien den Mäuseinokulationstest als Kontrolltest für die Immunfluoreszenz abgelöst (1,7,9). Das Prinzip des Zellkulturtests ist relativ einfach und Resultate liegen nach maximal 5 Tagen vor: Frisch oder vor 24h umgesetzte Zellkulturen werden mit den Hirnsuspensionen inokuliert und je nach gewählter Technik nach 24 bis 120 Stunden Inkubation bei 34-37°C fixiert und mittels Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein von Tollwuteinschlusskörperchen untersucht (Fig. 2).

Eigene Versuche mit dem Zellkulturtest lassen noch keine endgültigen Schlussfolgerungen zu. In Vorversuchen wurden einige Parameter der Zellkulturtechnik (Zellzahlen, Medium, Inkubationstemperatur, Inokulation mit/ohne Zentrifugation) optimiert und die Technik so weit etabliert, dass eine erste Auswahl von Proben untersucht werden konnte (Tab. 1). Entscheidende Bedeutung kommt der Überprüfung jedes Testansatzes mit einer schwach positiven Kontrolle zu. Mit dieser Kontrolle kann die Emp-



Tab. 1: Vergleich des Zellkulturtests mit der direkten Immunfluoreszenz

<u>Anzahl Proben</u>	<u>Kontrolle</u> ¹	<u>Immunfluoreszenz</u>	<u>Zellkultur</u>
46	+	+	+
11	+	+	-
31	+	-	-
<hr/>			
6	-	+	+
13	-	+	-
3	-	-	-

¹ Kontrolle = schwach positive Kontrolle, die in jedem Zellkulturansatz mitgeführt wird

fänglichkeit der verwendeten Zellkulturpassage für das Virus getestet werden. In Ansätzen, in denen die Kontrolle positiv war (88 Proben), wurden im Zellkulturtest gegenüber der Immunfluoreszenz im Hirnabklatschpräparat 19.3 % falsch negative Proben festgestellt.

Schlussfolgerungen

Der Zellkulturtest ist eine verlockende Alternative zum Mäuseinokulationstest. Er ersetzt einen Tierversuch und liefert schnellere Resultate. Angesichts der Bedeutung einer zuverlässigen Kontrolle für die Immunfluoreszenz-Routinediagnose der Tollwut müssen an eine solche Alternative jedoch sehr hohe Anforderungen punkto Sensitivität und Reproduzierbarkeit gestellt werden. In unseren Händen genügt diese Methode einem solchen Anforderungsprofil noch nicht. Die Sensitivität liegt mit 19.3% falsch negativen Ergebnissen noch in einem inakzeptablen Bereich. Sie unterliegt ausserdem im Zellkultursystem weit höheren Schwankungen als im Mäuseinokulationstest. Das grosse Problem in der Zellkulturtechnik ist die Gewährleistung einer konstanten Zellqualität über viele



Passagen. Deshalb müssen entsprechende Kontrollen in jedem Testansatz mitgeführt werden, damit Ansätze verworfen werden können, die den Anforderungen nicht genügen. Diese Vorsichtsmaßnahme wird natürlich dazu führen, dass auch der Zellkulturtest nicht immer innert weniger Tage abschliessende Ergebnisse liefert.

Die Ergebnisse anderer Autoren mit den gleichen Zellen (1,3,6-9) stimmen uns jedoch zuversichtlich, dass diese Probleme im Zellkulturtest mit einigen methodischen Modifikationen in absehbarer Zeit zu lösen sind. Rudd und Trimarchi (7) beschreiben eine vergleichbare Sensitivität der beiden Verfahren und haben in ihrem Laboratorium den Mäuseinokulationstest durch den Zellkulturtest ersetzt. Der Zellkulturtest wird auch am Institut Pasteur in Paris schon seit längerer Zeit anstelle des Mäuseinokulationstestes durchgeführt (1). Ein entsprechend verbesserter Zellkulturtest wird in unserem Laboratorium noch über eine längere Zeitspanne parallel zum Mäuseinokulationstest durchgeführt werden müssen, bevor dieser endgültig abgelöst werden kann.

Referenzen

1. Bourhy, H., P.E. Rollin, J. Vincent, and P. Sureau. 1989. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.* 27:519-523.
2. Dean, D.J., and M.K. Abelseth. 1973. The fluorescent antibody test. In: *Laboratory techniques in rabies*. Eds. M.M. Kaplan and H. Koprowski. p.73-83. World Health Organization, Geneva.
3. Iwasaki, Y., and H.F. Clark. 1977. Rabies virus infection in mouse neuroblastoma cells. *Lab. Invest.* 36:578-584.
4. Koprowski, H. 1973. The mouse inoculation test. In: *Laboratory techniques in rabies*. Eds. M.M. Kaplan and H. Koprowski. p.85-93. World Health Organization, Geneva.
5. Larghi, O.P., A.E. Nebel, L. Lazaro, and V.L. Savy. 1975. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. *J. Clin. Microbiol.* 1:243-245.
6. Rudd, R.J., and C.V. Trimarchi. 1987. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain



rabies virus. *J. Clin. Microbiol.* 25:1456-1458.

7. Rudd, R.J., and C.V. Trimarchi. 1989. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 27:2522-2528.
8. Smith, A.L., G.H. Tignor, R.W. Emmons, and J.D. Woodie. 1978. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology* 9:359-361.
9. Webster, W.A. 1987. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can. J. Microbiol.* 51:367-369.
10. WHO 1984. WHO expert committee on rabies, seventh report. p.1-104. World Health Organization, Technical report series, Geneva.