

УДК: 619:616.98:578.842.1

UDC: 619:616.98:578.842.1

**АДАПТАЦИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ К ПЕРЕВИВАЕМЫМ
КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК**

**ADAPTATION OF AFRICAN SWINE FEVER
VIRUS TO CONTINUOUS CELL CULTURES**

Прудникова Елена Юрьевна
аспирант

Prudnikova Elena Yurievna
Postgraduate student

Балышев Владимир Михайлович
д.б.н.

Balyshev Vladimir Mihaylovich
Dr.Sci.Biol.

Юрков Сергей Григорьевич
д.б.н.
*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно – исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Россельхозакадемии, г. Покров,
Россия*

Yurkov Sergey Grigorievich
Dr. Biol. Sci.
*State Research Institution National Research Institute
for Veterinary Virology and Microbiology of Russia of
the Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov,
Russia*

Гальнбек Татьяна Валерьевна
к.б.н.
*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно – исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
Россельхозакадемии, г. Москва, Россия*

Galnbek Tatyana Valerievna
Cand.Biol.Sci.
*State Research Institution National Research Institute
of Experimental Veterinary , Academy of Agricultural
Sciences of Russia , Moscow, Russia*

Балышева Вера Ивановна
д.б.н.
*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно – исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Россельхозакадемии, г. Покров,
Россия*

Balysheva Vera Ivanovna
Dr.Sci.Biol.
*State Research Institution National Research Institute
for Veterinary Virology and Microbiology of Russia of
the Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov,
Russia*

В статье представлены результаты адаптации вируса африканской чумы свиней к первичным и перевиваемым культурам клеток. Определены условия адаптации и подобрана наиболее перmissive линия клеток для размножения вируса

The article represents the results of African swine fever virus adaptation to continuous cell lines. We determined the conditions required for the adaptation and selected the cell lines most permissible for the virus proliferation

Ключевые слова: ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, АДАПТАЦИЯ, КУЛЬТУРА КЛЕТОК, ЦИТОПАТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ

Keywords: AFRICAN SWINE FEVER VIRUS, ADAPTATION, CONTINUOUS CELL LINE, CYTOPATHOGENIC EFFECT

Африканская чума свиней (АЧС) является одной из наиболее значимых и трудно контролируемых болезней домашних и диких свиней. Свойства вируса, обуславливающие особенности эпизоотологии, патогенеза, иммуногенеза, в сочетании с отсутствием эффективных вакцин [7,12], превращают африканскую чуму свиней в глобальную угрозу свиноводству. Единственно эффективными средствами контроля болезни

до настоящего времени являются быстрая диагностика в специально оснащенных центрах, уничтожение свинопоголовья в очагах, жесткое карантинирование неблагополучных территорий [2,5,6]. Разработка и совершенствование эффективных мер борьбы с АЧС требуют дальнейшего многостороннего изучения этой болезни и ее возбудителя.

При проведении молекулярно – генетических исследований с возбудителями вирусных болезней, а также при разработке вакцинных и диагностических препаратов широко используют культуральный вирусосодержащий материал, который, как правило, получают в перевиваемых культурах клеток. Учитывая имеющиеся в литературе сведения о размножении вируса африканской чумы свиней в первичных культурах клеток (культура костного мозга свиней, лейкоцитов свиней, альвеолярных макрофагов легкого свиньи, почек свиньи) [3, 9, 11, 13] были проведены исследования по адаптации вируса АЧС к первичным и перевиваемым культурам клеток.

Материалы, оборудование.

В работе использовали изоляты вируса АЧС, выделенные от больных и павших свиней в Волгоградской, Ставропольской, Астраханской, Мурманской областях, республике Кабардино-Балкария. Вирус африканской чумы свиней штамм Ставрополь в виде вирусосодержащей крови и культурального вируса, прошедшего 16 пассажей в культуре клеток костного мозга свиней, с активностью 7,0-7,5 и 6,0-6,5 lg ГАЕ₅₀/см³ соответственно; первичные культуры клеток костного мозга свиней (КМС), лейкоцитов свиней (ЛС); перевиваемые культуры клеток: почки сибирского горного козерога (ПСГК – 60), почки свиньи (РК – 15), почки африканской зеленой мартышки (Vero, CV - 1), получены из музея клеточных культур ГНУ ВНИИВВиМ РАСХН, А₄С₂ – гибридная линия клеток СПЭВ с лейкоцитами свиньи, получена из ГНУ ВИЭВ РАСХН; среда ИГЛА-МЕМ, 0,1% ГЛА на солевом растворе Эрла,

сыворотка крови свиньи, сыворотка крови крупного рогатого скота, фетальная сыворотка крови теленка, ФИТЦ – коньюгат, чашки карреля, 96 – луночный культуральный планшет.

Методы.

Клетки КМС получали из эпифизов крупных трубчатых костей (бедренной, берцовой, лучевой, плечевой, тазовых костей, позвонков), лейкоциты свиней – из дефибрированной крови здоровых подсвинков живой массой 30-45 кг [1]. Культивирование вируса АЧС в первичных культурах клеток КМС и ЛС проводили без адсорбции вируса на клетках и смены питательной среды, множественность заражения составляла 0,1-0,5 ГАЕ/кл. Инкубировали зараженную культуру 4 – 5 суток при 37 °С. Инфекционную активность исследуемых материалов определяли титрованием в культуре клеток КМС и ЛС общепринятым методом. Учет титрования проводили по феномену ГАД, основанному на адсорбции эритроцитов свиней на инфицированных вирусом АЧС клетках.

При адаптации вируса к перевиваемым культурам клеток использовали односуточную культуру, выращенную в пластиковых флаконах или чашках Карреля. Адаптацию проводили общепринятым методом с использованием адсорбции вируса в течение 60 минут и заменой ростовой питательной среды на поддерживающую среду с 2% сыворотки крови крупного рогатого скота и свиньи с последующим культивированием в течение 5 – 7 дней. В конце периода инкубации инфицированную культуру замораживали и оттаивали, чтобы разрушить структуру клеток и обеспечить полный выход вируса [4,8].

Результат.

При отработанных условиях культивирования исследуемые изоляты вируса АЧС размножались в культурах клеток КМС и ЛС без адаптации с проявлением гемадсорбции, которая характеризовалась многослойным прикреплением к пораженным клеткам эритроцитов свиней, в результате

чего они напоминали вид «красных ягод малины». В течение первых 24-48 часов эритроциты прочно удерживались на клетках и не отделялись при встряхивании. Через 48 – 72 часа после проявления гемадсорбции наблюдали лизис инфицированных клеток. Титр вируса в исходных, поступивших на исследование материалах варьировал от 1,5 до 5,0 lg ГАЕ₅₀/см³. В последующих пассажах накопление вируса АЧС в этих культурах достигало 6,0-7,0 lg ГАЕ₅₀/см³.

У изолята Североморск, выделенного в Мурманской области, титр вируса был несколько выше и на уровне 3-го пассажа достигал 7,5 lg ГАЕ₅₀/см³ (рис. 1).

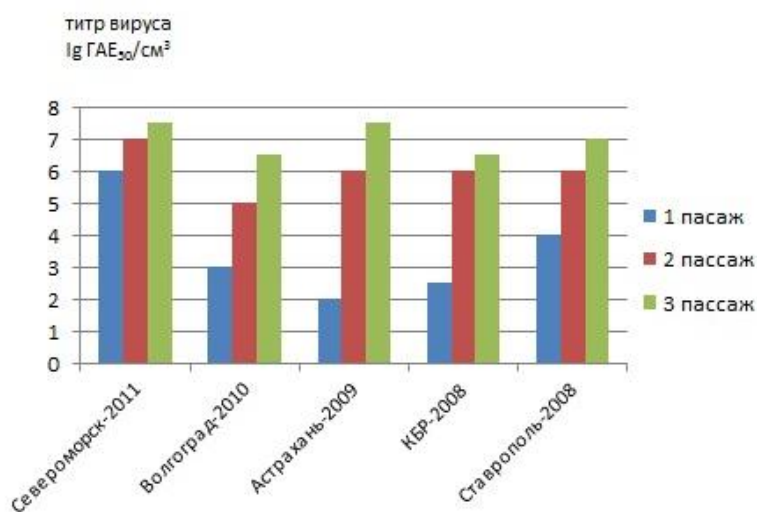


Рис.1. Накопление штаммов вируса АЧС в клетках КМС и ЛС.

Оптимальными условиями выращивания вируса АЧС в культурах клеток костного мозга и лейкоцитов свиней являлись: посевная концентрация клеток 3,0-3,5 млн/см³ (костный мозг) и 6,0-7,0 млн/см³ (лейкоциты); питательная среда 0,1% ГЛА на солевом растворе Эрла с 10,0% сыворотки крови свиней; длительность выращивания культуры клеток до заражения 48-72 часа; множественность заражения 0,1-0,5 ГАЕ/кл без адсорбции вируса на клетках и смены питательной среды; культивирование вируса при 37 °С 96-120 час. При этих параметрах

выращивания накопление вируса АЧС в культурах КМС и ЛС составляло 6,5-7,0 lg ГАЕ₅₀/см³.

Для адаптации вируса АЧС к перевиваемым культурам клеток на первом этапе использовали вирус в виде вируссодержащей крови. Однако он не размножался в перевиваемых культурах клеток в течение 10 последовательных пассажей. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали вирус АЧС, прошедший 16 пассажей в культуре клеток КМС.

Вирус АЧС при использовании поддерживающей среды с сывороткой крови крупного рогатого скота не размножался. В дальнейшем использовали поддерживающую среду, содержащую 2% сыворотки крови свиньи.

В процессе репродукции вируса АЧС на уровне 4-го пассажа на 5 день инкубации в зараженной культуре клеток А₄С₂ образовывались тяжи, в то время как в контрольной культуре изменения не обнаруживали. С седьмого пассажа цитопатогенное действие вируса характеризовалось образованием тяжей на 4 сутки, на 6-7 день – округлением клеток. С 9 пассажа в зараженной культуре клеток уменьшилась интенсивность образования тяжей, преобладало округление клеток, увеличение межклеточного пространства. На уровне 14 - 16 пассажей цитопатогенное действие характеризовалось округлением клеток, образованием агломератов и отслоением клеток от субстрата. Последующие пассажи характеризовались на 2 - 3 день инкубации вируса округлением клеток, увеличением межклеточного пространства, клетки увеличивались в размере, теряли митотическую активность; на 4 - 5 день клетки отслаивались от субстрата, поражение монослоя составляло 70-80% (рис. 2). С 18 пассажа длительность инкубации составляла 4 – 5 суток.

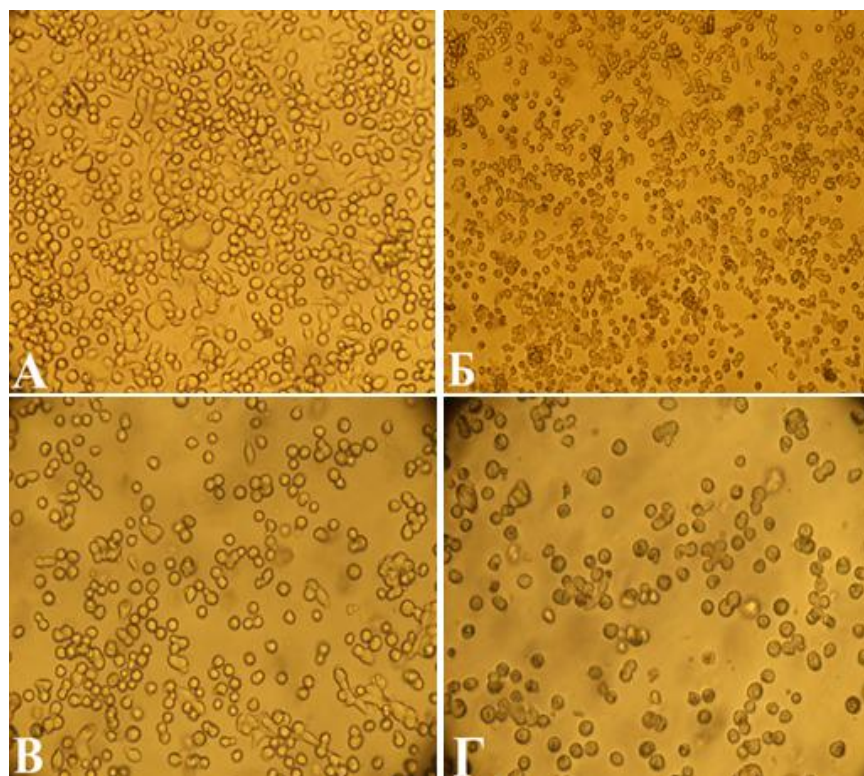


Рис. 2. Цитопатогенное действие вируса АЧС штамм Ставрополь в перевиваемой культуре клеток A_4C_2 : А) нормальная культура клеток; Б) инфицированная культура клеток 3 день после заражения; В) инфицированная культура клеток 4 день после заражения; Г) инфицированная культура клеток 5 день после заражения.

Прошедший более 20 пассажей вирус АЧС размножался в перевиваемой культуре клеток A_4C_2 с использованием поддерживающей среды Игла – МЕМ с 2% фетальной сыворотки крови теленка, не теряя своей вирусной активности. Однако срок инкубации увеличился до 7 суток и изменился характер ЦПД, которое характеризовалось образованием тяжей, состоящих из округлых клеток, образованием окон с последующей гибелью клеток и отслоением их от субстрата. Максимальные деструктивные изменения наблюдали на 6 – 7 сутки культивирования.

Одним из характерных свойств вируса АЧС является способность образовывать гемадсорбцию на инфицированных клетках КМС и ЛС. Однако в перевиваемых культурах вирус АЧС размножался без проявления гемадсорбции. Так как перевиваемая культура клеток A_4C_2

является гибридной линией клеток СПЭВ и лейкоцитов свиньи, то была изучена способность вируса к гемадсорбции в данной культуре. При добавлении 0,5 % взвеси эритроцитов свиней к инфицированной культуре клеток A_4C_2 на 2 – 3 день инкубации через 24 – 48 часов на поверхности инфицированных вирусом АЧС клетках отмечали «плотную» гемадсорбцию (рис. 3).

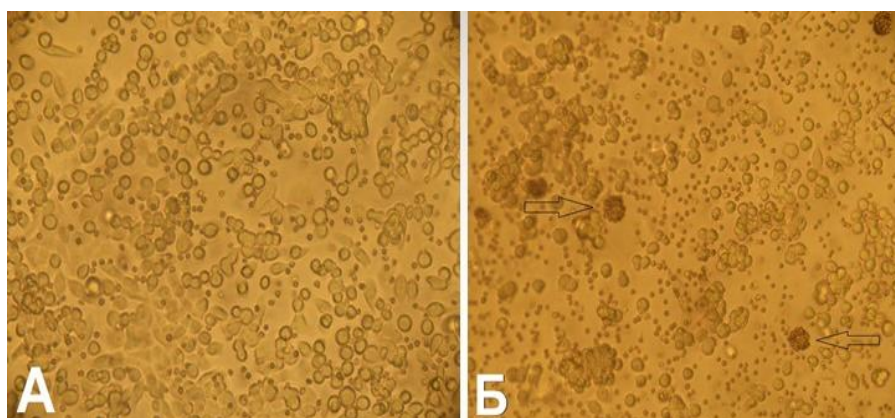


Рис. 3. Гемадсорбция на перевиваемой культуре клеток A_4C_2 : А) нормальная культура клеток; Б) зараженная культура клеток.

На уровне 7-8 пассажей штамм Ставрополь при аналогичных условиях культивирования вызвал ЦПД в перевиваемых культурах клеток РК-15 и ПСГК-60, ЦПД характеризовалось разрушением клеток, образованием «окон» в монослое.

В культуре клеток CV - 1 штамм Ставрополь не вызывал ЦПД в течение 15 последовательных пассажей.

Вирус АЧС, прошедший более 20 пассажей в перевиваемой культуре клеток A_4C_2 , вызывал с первого пассажа ЦПД в культурах как гомологичного (ПСГК, РК – 15), так и гетерологичного происхождения (CV - 1, Vero) (рис. 4).

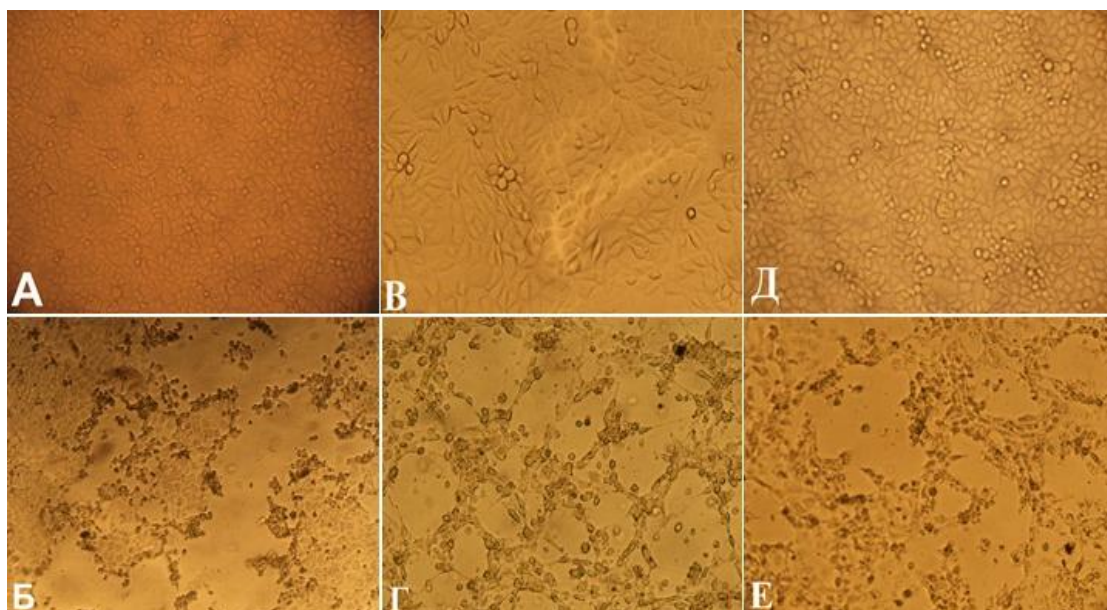


Рис. 4. Цитопатогенное действие вируса АЧС штамм Ставрополь в перевиваемых культурах клеток. Нормальная культура клеток: А – CV; В - ПСГК – 60; Д - РК – 15; зараженная культура клеток: Б – CV; Г - ПСГК – 60; Е – РК – 15.

Накопление вируса определяли титрованием в культурах клеток КМС и ЛС или в реакции прямой иммунофлуоресценции (РПИФ). Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в $lg \text{ГAE}_{50}/\text{cm}^3$ или $\text{БОE}_{50}/\text{cm}^3$ [8, 10].

В процессе адаптации к перевиваемой культуре клеток A_4C_2 в первых пассажах отмечали снижение титра вируса с 6,0 до 2,0 $lg \text{ГAE}_{50}/\text{cm}^3$ (на уровне 6 пассажа), с 7 по 12 пассаж титр вируса увеличивался, а с 14 пассажа оставался стабильным и составлял 6,0 - 6,5 $lg \text{ГAE}_{50}/\text{cm}^3$. В перевиваемых культурах клеток ПСГК – 60, РК – 15 титр вируса был на 1,5 – 2 $lg \text{ГAE}_{50}/\text{cm}^3$ ниже.

Вирус АЧС в инфицированной культуре клеток РПИФ не обнаруживали со 2 по 10 пассажи. Однако с нарастанием титра вируса увеличивалось количество инфицированных клеток, показанных РПИФ. При определении титра вируса его значение, как правило, было на 1,0 – 1,5 lg ниже, чем определяемый в реакции гемадсорбции.

Заключение.

Таким образом, для адаптации вируса АЧС к перевиваемым культурам клеток необходимо проведение пассажей вируса в первичных культурах клеток КМС или ЛС с применением поддерживающей среды с сывороткой крови свиньи. При адаптации к перевиваемым культурам клеток гомологичного (А₄С₂, ПСГК-60, РК-15) и гетерологичного (СV - 1) происхождения, установлено, что наиболее перmissive линией клеток является линия А₄С₂. Получен адаптированный вариант вируса АЧС штамм Ставрополь в культуре клеток А₄С₂, прошедший более 30 пассажей. Полученное на его основе сырье может быть использовано для проведения вирусологических и молекулярно-генетических исследований с этим возбудителем.

Литература.

1. Африканская чума свиней // Инфекционная патология животных: в 2 – х т. / гл. ред. А.Я. Самуйленко и др. – М. – Т.1. 2006. – 807 - 817 с.;
2. Африканская чума свиней - главная проблема для свиноводства России/ В.В. Куриннов, Д.В. Колбасов, С.Ж. Цыбанов// Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. - 2010. - №3 - С. 82-87;
3. Патология клеток лимфоидной ткани, *in vitro* инфицированных вирусом африканской чумы свиней / Е. М. Каралова, Г. Е. Восканян, Х. В. Саркисян, Л. О. Аброян, А. С. Аветисян, Л. А. Акопян, З. Б. Семерджян, О. С. Закарян, Г. А. Арзуманян, З. А. Каралян // Вопросы вирусологии. – 2011. - №1. – С. 33 – 37;
4. Репин, В.И., Петров, Ю.И., Киселев, А.В., Юрков, С.Г., Черятников, Л.Л., Черных, Н.В., Симонова, Э.Г. Использование перевиваемых линий клеток для размножения штамма «Катанга - 350» вируса АЧС // Классическая чума свиней – неотложные проблемы науки и практики: Материалы научно – практической конференции ВНИИВВиМ / ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 1995. – С. 139 – 140;
5. African swine fever: how can global spread be prevented? / S. Costard, B. Wieland, W. Glanville, F. Jori, R. Rowlands, W. Vosloo, F. Roger, D.U. Pfeiffer, L.K. Dixon // Phil. Trans. R. Soc. B. – 2009.- Vol. 364.- P. 2683-2696;
6. Arias, M. African swine fever/ M. Arias, J.M. Sanchez-Vizcaino// Trends in Emerging Viral Infections of Swine.- Burlington: Iowa State University Press, 2002. - P. 119-124;
7. Botija, S. Modification of the African swine fever virus by passage in cell cultures/ Bull. Off. Int. Epiz.- 1963.- Vol. 60. – P. - 901-919;
8. Enjuanes, L. Titration of African Swine Fever Virus/ L. Enjuanes, A.L. Carrascosa, M.A. Moreno, E. Vinuela // J. gen. Virol.- 1976.- Vol. 32.- P. 471-477;

9. Experimental African Swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells / J.C. Gomes – Villamandos, J. Hervas, A. Mendez, L. Carrasco, J. M. Mulas, C. J. Villeda, P. J. Wilkinson, M.A. Siarra // *J. Gen. Virol.* – 1995. – Vol. 76. – P. 2399 – 2405;
10. Immunofluorescence Plaque Assay for African Swine Fever Virus / J. Tessler, W. R. Hess, I. C. Pan, R. Trautman // *Can. J. comp. Med.* – 1974. - Vol. 38, - P. 443 – 447;
11. Greig, A.S. African Swine Fever V. Cultivation of the Virus in Primary Pig Kidney Cells // A.S. Greig, P. Boulanger, G.L. Bannister// *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* – 1967.- Vol. 31. –P. 24-31;
12. Tulman, E.R. African swine fever virus / E.R. Tulman, G.A. Delhon, B.K. Ku // *Curr. tor. microbial and immunol.* – 2009. - № 328. – P. 43 – 87;
13. Wardley, R.C. African Swine Fever Virus Replication in Porcine Lymphocytes / R.C. Wardley, P. J. Wilrinson, F. Hamilton // *J. gen. Virol.* – 1977. – Vol. 37, № 5. – P. 425 – 427.