

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНЫМ ЦЕНТРОМ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ СЕРТИФИКАТА GMP

Международный стандарт GMP — это один из основных стандартов, который регламентирует требования к осуществлению производственной деятельности по выпуску лекарственных препаратов и контролю за их качеством.

В августе–сентябре 2015 года в подведомственном Россельхознадзору ФГБУ «ВНИИЗЖ» был осуществлен сертификационный аудит на соответствие требованиям GMP ЕС (надлежащей производственной практики Европейского союза).

15 декабря 2015 года ФГБУ «ВНИИЗЖ» был получен сертификат GMP № ARR010915, выданный GA PHARMA CONSULTING, на соответствие требованиям «Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» Европейского союза. Настоящий сертификат подтверждает, что лекарственные средства для ветеринарного применения, производимые ФГБУ «ВНИИЗЖ», соответствуют EudraLex, «Том 4. Руководство ЕС по надлежащей практике производства лекарственных препаратов для человека и животных», изданного в соответствии с Директивой 2003/94/ЕС.

Для крупнейшего национального производителя иммунобиологических лекарственных средств

ФГБУ «ВНИИЗЖ» выполнение требований GMP дает определенное конкурентное преимущество на рынке лекарств, но также влечет за собой значительное увеличение затрат на техническое и технологическое перевооружение, изменение системы организации производства и контроля лекарственных средств.

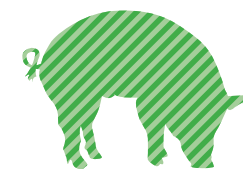


ОБУЧЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНЫХ СПЕЦИАЛИСТОВ КИРГИЗИИ

В соответствии с соглашением между Правительством Российской Федерации и Правительством Кыргызской Республики с 14 по 25 декабря 2015

года на базе подведомственного Россельхознадзору ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» прошло обучение специалистов ветеринарной службы Кыргызской Республики по вопросам эпизоотологии и анализу риска в ветеринарной практике, пищевой биобезопасности, лабораторной диагностики инфекционных болезней животных, в том числе таких особо опасных, как ящур, африканская и классическая чума свиней, высокопатогенный грипп птиц, они ознакомились с нормативно-правовыми актами Евразийского экономического союза (Таможенного союза). К чтению лекций и проведению практических занятий были привлечены ведущие сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также главный эксперт ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (Россельхознадзор, г. Москва).

В конце занятий был проведен круглый стол, слушатели получили комплекты современной научно-методической литературы по тематике, им вручили документы об успешном прохождении обучения.



БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ SWINE DISEASE

УДК 619:578.842.1:57.082.26

ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ НА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЕЙ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

И.Ю. Жуков¹, И.В. Шевченко², Н.Н. Власова³, А.А. Варенцова⁴, Б.Л. Манин⁵, О.С. Пузанкова⁶, В.Л. Гаврилова⁷, А.С. Иголкин⁸

¹ ведущий биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhukov@arriah.ru

² ведущий биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko@arriah.ru

³ главный научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

⁴ младший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: varentsova@arriah.ru

⁵ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin_bl@arriah.ru

⁶ старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: puzankova@arriah.ru

⁷ научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: gavrilova_vl@arriah.ru

⁸ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе приводятся данные по получению клеток костного мозга свиней, селезенки свиней, лимфатических узлов, свиной почки, тестикул свиней, используемых для репродукции вируса африканской чумы свиней. Изучение сохранности клеток при криоконсервировании проводили только с культурой клеток костного мозга свиней. Замораживание и хранение проводили при -70, -150 и -196°C. В качестве криопротектора применяли диметилсульфоксид в концентрации 10% с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. После размораживания клеток и освобождения от криопротектора для предотвращения агрегации клеток добавляли 10 МЕ/мл гепарина натрия. Самые высокие гемадсорбирующие титры были получены при культивировании вируса африканской чумы свиней на культуре клеток костного мозга свиней, хранившейся при температуре -150 и -196°C в течение 5–6 месяцев, они составляли $5,76 \pm 0,25 \lg \text{ГД}_{50}/0,15 \text{ см}^3$ и $(4,66–4,87) \pm 0,25 \lg \text{ГД}_{50}/0,15 \text{ см}^3$ соответственно. Клетки костного мозга свиней сохраняли свою жизнеспособность только в течение 4 месяцев хранения при -70°C и после размораживания были способны поддерживать репродукцию вируса на уровне $(3,2–3,86) \pm 0,25 \lg \text{ГД}_{50}/0,15 \text{ см}^3$.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней, культура клеток костного мозга свиней, гемадсорбирующий титр вируса.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозное вирусное заболевание свиней, характеризующееся явлениями острого токсикоза, геморрагическим диатезом и заканчивающееся почти всегда летальным исходом [6]. Болезнь ранее регистрировали в Африке, Испании, Португалии, Франции, Бразилии и на Кубе. Из ранга эпизоотий данное заболевание переходит по некоторым параметрам в панзоотию [1, 2].

Экономический ущерб для свиноводства при заносе и дальнейшем распространении вируса АЧС огромен [8]. Достоверная и своевременная постановка диагноза является основным звеном в мероприятиях по предотвращению дальнейшего распространения инфекции [10].

Для диагностики АЧС используют клеточные системы, полученные *in vitro* от чувствительных к данному заболеванию животных (*Sus scrofa*). К ним относятся клетки, полученные как из органов (свиной почки, тестикул свиней), так и из клеток кроветворной системы (клеток костного мозга, лимфатических узлов, селезенки свиней) [6, 8]. Все перечисленные первичные клеточные культуры по-разному чувствительны к вирусу АЧС, поэтому не все клетки принимают участие в репродукции

вируса. Но методически правильное получение этих систем делает их незаменимым звеном в исследованиях. Кроме первичных культур клеток для диагностики и выделения вируса АЧС можно использовать перевиваемые линии клеток, полученные от разных животных, включая обезьян (Vero-V, CV-1). Но предпочтение отдаётся гомологичным объектам и самым чувствительным клеткам [11–15].

Получение свежих клеток костного мозга и других первичных объектов является трудоемким процессом, поэтому была предпринята попытка изучения условий хранения суспензий клеток при низких и сверхнизких температурах и их влияния на репродукцию вируса АЧС после размораживания.

В медицинской науке и практике криоконсервирование клеток костного мозга активно применяется при трансплантации различных патологий [5]. В фундаментальных работах были отработаны основные методические подходы к данной проблеме. Был определён широкий спектр используемых для криоконсервирования клеток криопротекторов: ПЭО-400, этиленгликоль, ДМСО и др. [3]. Известно, что скорость замораживания клеток костного мозга после кристаллизации должна быть очень высокой для предотвращения внутриклеточной кристаллизации, что было учтено в данной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали поросят 2–4-месячного возраста массой 15–30 кг, полученных из хозяйств Владимирской области, благополучных по инфекционным болезням.

После декапитации поросят проводили изолирование трубчатых костей для получения культур клеток костного мозга свиней (КК КМС) [4, 7, 9] и стерильно изымали селезенку, тестикулы, лимфоузлы, почки [1]. Клетки тщательно измельчали, заливали физиологическим раствором с добавлением антибиотиков: бензилпенициллина калиевой/натриевой соли, стрептомицина, цефотаксима, гентамицина, метронидазола. Для трипсинизации брали 0,25% раствор трипсина для свиной почки (СП). Для лучшего вымывания суспензию клеток встряхивали на термошейкере при t=37°C в течение 30 мин. Надосадок сливали в стерильную емкость с фетальной сывороткой крупного рогатого скота (ФС КРС, 10% от основного состава). К осадку добавляли свежую порцию 0,25% раствора трипсина для СП, вновь встряхивали на термошейкере вышеуказанным способом, и полученный надосадок объединяли в одной емкости, фильтровали через марлю и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Получившийся осадок ресуспендировали в среде с добавлением гепарина натрия 10 МЕ/мл, который способствовал разделению конгломератов на отдельные клетки. Затем, для освобождения от гепарина натрия, снова центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в среде, фильтровали через фильтр Cell Strainer фирмы SDL с диаметром пор 70 мкм, разводили до необходимой концентрации. Для посева культур клеток использовали питательные среды Игла, ПСП, DMEM/F-12, содержащие 20% ФС КРС. Подсчет клеток проводили как с использованием стандартных прикладных методов (подсчет в камере Горяева), так и в автоматическом счетчике клеток Countess™ (Invitrogen™, Корея). Первичные культуры клеток вносили в пластиковые

96-луночные планшеты, пластиковые флаконы площадью 25 см². Культивировали культуры клеток в CO₂-инкубаторе с содержанием 5% CO₂.

Трипсинизацию костного мозга свиней проводили подобным образом, но вместо 0,25% раствора трипсина использовали смесь растворов трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в соотношении 1:5 в объеме 50 мл на 450 мл среды Игла.

Для постановки реакции гемадсорбции вируса АЧС готовили рабочую суспензию эритроцитов свиньи. Для этого отбирали 200 мл крови у поросенка в стерильный флакон со стеклянными бусинами, который встряхивали в течение 30 мин на шуттель-аппарате до образования фибриновых сгустков. Затем кровь фильтровали через воронку со стерильной 4-слойной марлей. Отфильтрованную кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10–15 мин для отделения сыворотки, которую затем отбирали в отдельный флакон. Осадок эритроцитов трижды промывали физиологическим раствором (по 50 мл) и вновь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10–15 мин. Оставшиеся в осадке эритроциты разводили физиологическим раствором 1:10 и получали матровую (основную) суспензию. К полученной суспензии добавляли 50 мкл/мл гентамицина и хранили 1 мес. при t=4°C. Из матровой делали рабочую суспензию эритроцитов. Для этого брали 1 мл суспензии и добавляли 9 мл физиологического раствора.

В данной работе КК КМС инфицировали изолятом Одицово 02/14 вируса АЧС в дозе 0,1–0,01 ГАД_{E₅₀}/кл.

В качестве криопротекторов применяли диметилсульфоксид (ДМСО) [3] в концентрации 10%, а также добавляли 10% ФС КРС. Суспензию КК КМС в концентрации 5,0×10⁶ кл./см³ фасовали в пластиковые пробирки в объеме 5,0 мл и хранили в течение 6 мес. при температуре -70, -150 и -196°C в жидком азоте в сосуде Дьюара. После 1, 2, 3, 4, 5, 6 мес. хранения КК КМС размораживали при комнатной температуре и разводили в среде Игла. Затем суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 15 мин. Удаляли надосадок, осадок растворяли в среде Игла, подсчитывали общее количество клеток и процент выживших, которые высевали в 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку. Через 48 ч без смены среды КК КМС заражали вирусом АЧС. Гемадсорбирующую активность вируса АЧС в КК КМС учитывали на 5–7 сутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки, полученные из разных органов (костного мозга, селезенки, тестикул, почки, лимфатических узлов), обладают разными размерами и полиморфизмом, поэтому была проведена работа по подбору концентрации клеток для получения конфлюэнтного (сомкнутого) слоя для проведения полноценных вирусологических работ.

В процессе получения суспензии клеток КМС использовали гепарин натрия 10 МЕ/мл, встряхивали на шейкере при t=37°C в течение 30 мин для предотвращения агрегации кровяных клеток при замораживании. Подобным образом обрабатывали гепарином натрия и другие культуры клеток: селезенки свиней (СС), лимфатических узлов (ЛУ), тестикул свиней (ТС), свиной почки (СП).

Посев производили в матрасы площадью 25 см² и в лунки 96-луночных планшетов. Посевная концентрация клеток и вносимый объем представлены в табл. 1.

Таблица 1
Скрининг (подбор) концентрации клеток для получения конфлюэнтного монослоя во флаконах площадью 25 см² и в 96-луночных планшетах

Культура клеток	Концентрация клеток в 1 мл	Объем клеточной суспензии, вносимый	
		в матрасы (S=25 см²)	в 96-луночные планшеты
КМС	6–8 млн	10 мл	100 мкл
СП	500 тыс.		
ЛУ	6–8 млн		
СС	6 млн		
ТС	500 тыс. – 2 млн		

Согласно полученным в экспериментах данным (табл. 1), наибольшая концентрация клеток необходима для посева клеток КМС, ЛУ и клеток СС. Для получения сплошного клеточного монослоя клеток СП требуется в четыре раза меньше, а концентрация клеток ТС может варьировать от 500 тыс. до 2 млн. В экспериментах клеточный монослой вырастал при этих концентрациях через 24–72 ч. Инокулируемый объем клеточной суспензии не зависел от вида клеточной суспензии и составлял 10 мл во флакон S=25 см² и 100 мкл в одну лунку 96-луночного планшета. В матрасах и лунках планшетов с клетками КМС меняли питательную среду через 48 ч, а среду Игла в матрасах с клетками СС, ЛУ, ТС и СП меняли через 48–72 ч. Среда Игла также содержала 20% ФС КРС.

Монослой КК КМС инфицировали изолятом Одицово 02/14 вируса АЧС в дозе 0,1–0,01 ГАД_{E₅₀}/кл. Титрование вируса АЧС, полученного через 5–7 суток после инфицирования, проводили в 96-луночных планшетах [4]. Титры вируса АЧС составляли в пределах от 6,5 до 7,0±0,25 lg ГАД_{E₅₀}/0,15 см³.

Затем проверяли чувствительность к вирусу АЧС клеток КМС, хранившихся в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 мес. при температурах -70, -150 и -196°C. Суспензию клеток освобождали от консерванта путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в среде, подсчитывали количество и процент выживших клеток, который высевали в 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку. Через 48 ч КК КМС заражали вирусом АЧС. Гемадсорбирующую активность вируса АЧС учитывали на 5–7 сутки. Результаты репродукции вируса АЧС на КК КМС при трех температурах хранения показаны в табл. 2–4.

Результаты экспериментов (табл. 2) показали, что количество живых клеток КМС после размораживания при хранении в течение 5–6 мес. при -70°C равно 0. При хранении в течение 1–4 мес. процент живых клеток колебался от 57 до 7%. Гемадсорбирующий титр вируса АЧС на КК КМС составлял в пределах от 3,2±0,25 до 3,86±0,25 lg ГАД_{E₅₀}/0,15 см³.

Как видно из результатов табл. 3, процент живых клеток по мере увеличения сроков хранения КК КМС при t=-150°C снижался с 95 до 37%, при этом гемадсорбирующий титр вируса АЧС составлял 5,76±0,25 lg ГАД_{E₅₀}/0,15 см³.

По полученным данным (табл. 4) определено, что при хранении при -196°C количество живых клеток в процентном отношении существенно не менялось в течение 6 мес. и составляло от 72 до 89%. Количе-

ство клеток после размораживания было в пределах от 1,7×10⁶ до 1,3×10⁶ кл./см³. Гемадсорбирующий титр составлял от 4,66±0,25 до 4,87±0,25 lg ГАД_{E₅₀}/0,15 см³.

В результате проведенных исследований выяснили, что концентрация клеток при первоначальном замораживании клеточной суспензии составляла 5,0×10⁶ кл./см³, а уже через месяц количество клеток снизилось в 3 раза и оставалось на этом уровне в течение всего срока наблюдения.

Следовательно, при закладывании на хранение КК КМС при температуре -196°C необходимо брать максимально возможную концентрацию клеток.

Из табл. 2–4 видно, что, независимо от температуры хранения, клетки КМС образовывали монослой в лунках планшетов, достаточный для титрования вируса АЧС. Гемадсорбирующий титр вируса АЧС на КК КМС, полученный при посеве клеток, хранившихся при -150°C, составлял 5,76±0,25 ГАД_{E₅₀}/0,15 см³. Процент сохранности клеток при -196°C был такой же высокий, как и при хранении при -150°C, но титр вируса снижался до (4,66–4,87)±0,25 ГАД_{E₅₀}/0,15 см³.

В дальнейших наших исследованиях по изучению морфологии клеток КМС с помощью люминесцентной

Таблица 2
Сохранность клеток КМС и титр вируса АЧС после дефростации с -70°C

Время хранения, мес.	Кол-во клеток после размораживания	% живых клеток	Титр вируса АЧС, lg ГАД _{E₅₀} /0,15 см³
1	4,5×10 ⁶	57	(3,2–3,86)±0,25
2	4,3×10 ⁶	30	
3	4,3×10 ⁶	28	
4	3,2×10 ⁶	7	
5	2,8×10 ⁶	0	
6	2,0×10 ⁶	0	

Таблица 3
Сохранность клеток КМС и титр вируса АЧС после дефростации с -150°C

Время хранения, мес.	Кол-во клеток после размораживания	% живых клеток	Титр вируса АЧС, lg ГАД _{E₅₀} /0,15 см³
1	4,4×10 ⁶	95	5,76±0,25
2	4,2×10 ⁶	94	
3	3,2×10 ⁶	91	
4	4,1×10 ⁶	54	
5	4,4×10 ⁶	39	
6	3,0×10 ⁶	37	

Таблица 4
Сохранность клеток КМС и титр вируса АЧС после дефростации с -196°C

Время хранения, мес.	Кол-во клеток после размораживания	% живых клеток	Титр вируса АЧС, lg ГАД _{E₅₀} /0,15 см³
1	1,7×10 ⁶	89	(4,66–4,87)±0,25
2	1,7×10 ⁶	85	
3	1,6×10 ⁶	82	
4	1,3×10 ⁶	80	
5	1,4×10 ⁶	80	
6	1,4×10 ⁶	72	

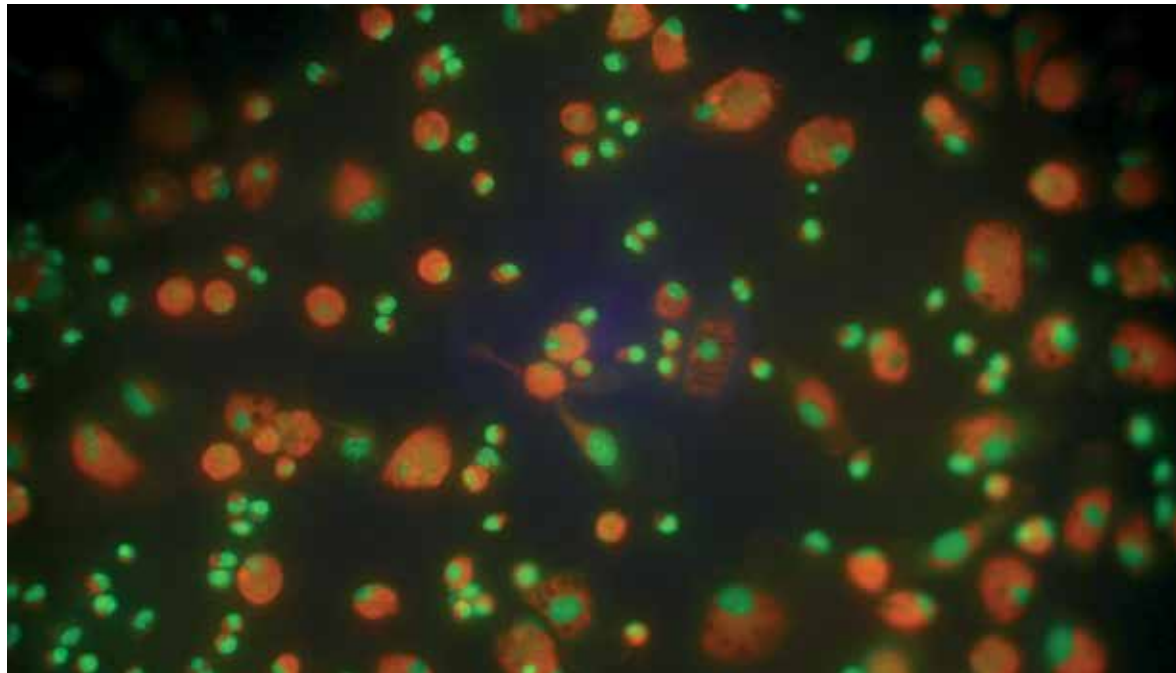


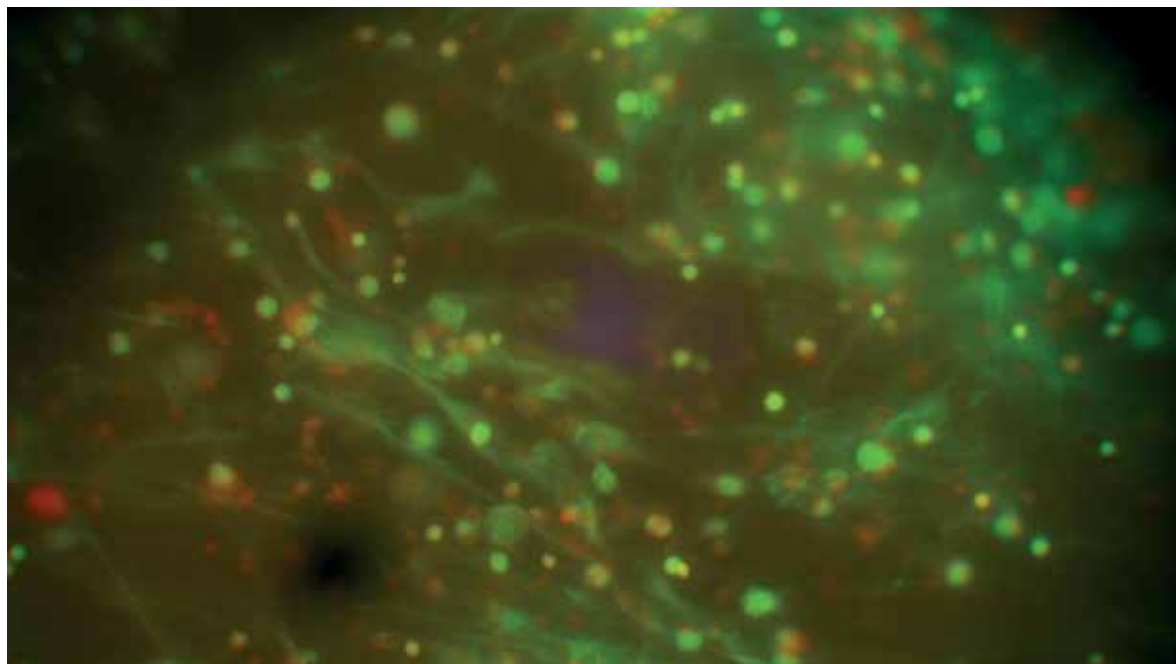
Рис. 1. Клетки костного мозга, окрашенные акридиновым оранжевым (0,01%), 24 ч после посева

микроскопии (окуляр $\times 10$; объектив $\times 60$) был выявлен полиморфизм клеток.

На рис. 1 видно, что в препарате находилось 2 типа клеток: мелкие с зелёными ядрами — это клетки костного мозга, крупные адгезированные — стромальные клетки.

После хранения КК КМС при -196°C (рис. 2) в течение 3 мес. количество стромальных клеток стало меньше, большое количество мелких кроветворных клеток костного мозга свиней с зелёными ядрами оказалось среди волокон внеклеточного матрикса.

Рис. 2. Клетки костного мозга, окрашенные акридиновым оранжевым (0,01%), 3 мес. хранения при -196°C в жидком азоте



После 6 мес. хранения клеточной суспензии КМС в жидком азоте при -196°C выживаемость клеток была достаточно высокой — 72% живых клеток (рис. 3).

Следовательно, адгезивная способность стромальных клеток при длительном хранении (срок наблюдения — 6 мес.) снижается меньше, чем кроветворных клеток КМС.

ВЫВОДЫ

1. В результате экспериментов установлено, что при получении суспензии клеток КМС, КС, ЛУ добавление 10 МЕ/мл гепарина натрия предотвращает их агрегацию. После встряхивания на термощейкере при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин в поле зрения микроскопа

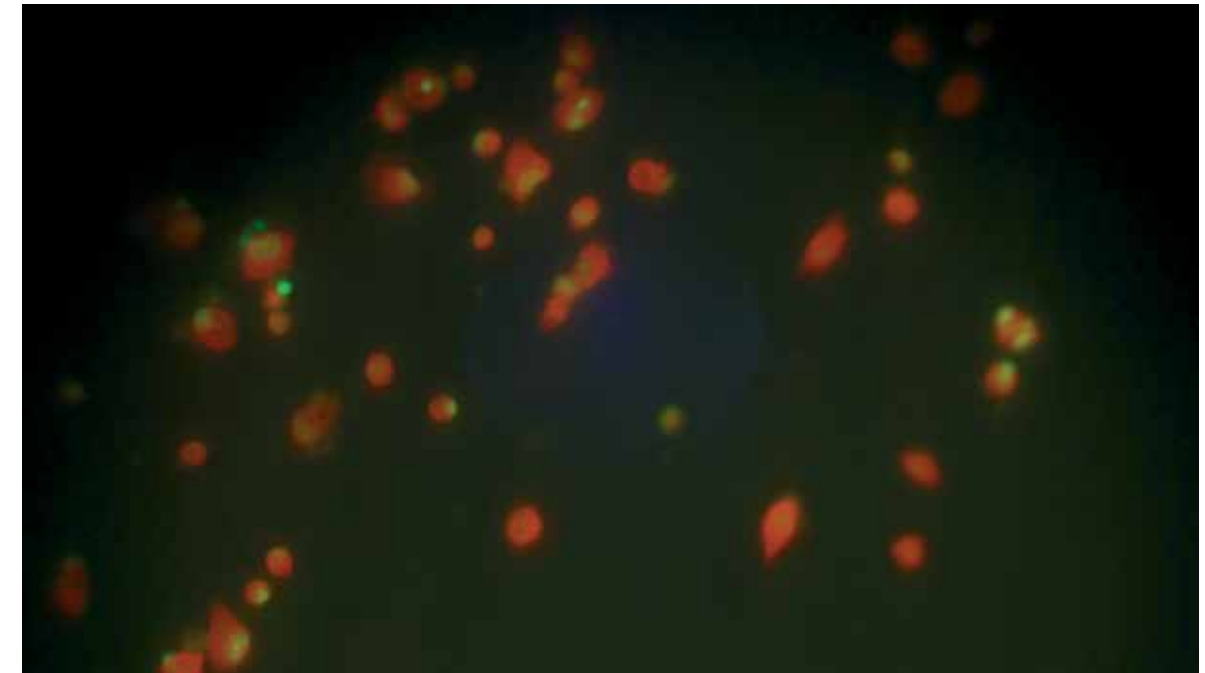


Рис. 3. Клетки костного мозга, окрашенные акридиновым оранжевым (0,01%), 6 мес. хранения при -196°C в жидком азоте

наблюдается не более 1–2 конгломератов (увеличение 1×10).

2. Культура клеток КМС лучше всего сохранялась при температуре -150 и -196°C в течение 5–6 мес., гемадсорбирующие титры вируса АЧС при этом составляли $5,76\pm 0,25 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/0,15 \text{ см}^3$ и $(4,66-4,87)\pm 0,25 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/0,15 \text{ см}^3$ соответственно.

3. Хранение культуры клеток КМС при -70°C ограничивалось 4 мес., процент живых клеток после размораживания составлял от 57 до 7%, при этом титр вируса АЧС определяли на уровне $(3,2-3,86)\pm 0,25 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/0,15 \text{ см}^3$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре. — М., 2009. — 120 с.
- Макаров В.В., Сухарев О.И., Литвинов О.Б. Система «клещи рода *Ornithodoros* — вирус африканской чумы свиней»: биоэкология, вирусология, эпизоотология // Ветеринарная патология. — 2011. — № 3. — С. 18–19.
- Манин Б.Л. Криоконсервирование и культивирование клеточных линий — две фазы существования биологических объектов // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2008. — Т. 6. — С. 390–405.
- Методические рекомендации по получению культуры клеток костного мозга свиней для изучения культуральных свойств изолятов вируса африканской чумы свиней / А.А. Варенцова, И.Ю. Жуков, В.Л. Гаврилова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 14 с.
- Низкотемпературное консервирование костного мозга / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, А.А. Цуцаева [и др.]. — Киев: Наук. Думка, 1976. — 288 с.
- Оптимизация условий получения культуры клеток костного мозга свиней / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.А. Варенцова [и др.] // IV Международная на-

учно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и наука XXI» 16–20.09.14 г.: сб. научных трудов. Т. 1. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. — С. 46–52.

7. Оптимизация условий хранения альвеолярных макрофагов и клеток костного мозга свиней при низких температурах / О.С. Пузанкова, И.Ю. Жуков, А.А. Варенцова [и др.] // IV Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и наука XXI» 16–20.09.14: сб. научных трудов. Т. 1. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. — С. 103–111.

8. Способы культивирования вирусов. Культура клеток. — URL: medicalplanet.su/1372/html (дата обращения: 20.11.15).

9. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. — М.: Медицина, 1978. — 200 с.

10. Шишков В.П. Ветеринарный энциклопедический словарь. — М.: Советская энциклопедия, 1981. — С. 247–248.

11. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Interaction entry of African swine fever virus with macrophages // Virus Res. — 1990. — Vol. 17, № 2. — P. 93–104.

12. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. — 1989. — Vol. 168, № 2. — P. 393–398.

13. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. The entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. — 1989. — Vol. 171, № 1. — P. 68–75.

14. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into Vero cells does not require virus replication / A.L. Carrascosa, M.J. Bustos, M.L. Nogal [et al.] // Virology. — 2002. — Vol. 294, № 2. — P. 372–382.

15. Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages / S. Basta, H. Gerber, A. Schaub [et al.] // Veterinary Microbiology. — 2010. Vol. 140, №1–2. — P. 9–17.

STUDY OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS REPRODUCTION IN PORCINE PRIMARY BONE MARROW CELL CULTURE BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

I.Yu. Zhukov¹, I.V. Shevchenko², N.N. Vlasova³, A.A. Varentsova⁴, B.L. Manin⁵, O.S. Puzankova⁶, V.L. Gavrilova⁷, A.S. Igolkin⁸

¹ Leading Biologist, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zhukov@arriah.ru
² Leading Biologist, PhD student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shevchenko@arriah.ru
³ Chief Researcher, Doctor of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru
⁴ Junior Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: varentsova@arriah.ru
⁵ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: manin_bl@arriah.ru
⁶ Senior Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: puzankova@arriah.ru
⁷ Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: gavrilova_vl@arriah.ru
⁸ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

SUMMARY

This paper presents data on the preparation of cells from porcine bone marrow, spleen, lymph nodes, kidneys and testicles used for African swine fever virus reproduction. Viability of cells after cryopreservation was studied only in porcine bone marrow cell culture. The cell culture was frozen and stored at -70, -150 and -196°C. 10% dimethyl sulfide supplemented with 10% of fetal bovine serum was used as a cryoprotectant. When the cells were thawed and the cryoprotectant was removed 10 IU/ml of heparin sodium was added to prevent cell aggregation. ASFV culturing in porcine bone marrow cell culture stored at -150 and -196°C during 5-6 months demonstrated the highest haemadsorption titers: 5,76±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³ and (4,66–4,87)±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³, respectively. Porcine bone marrow cells remained viable only for four months of storage at -70°C and were able to maintain the virus reproduction at the level of (3,2–3,86)±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³ when thawed..

Key words: African swine fever virus, porcine bone marrow cell culture, virus hemadsorption titer.

INTRODUCTION

African swine fever (ASF) is a mostly lethal contagious viral disease in pigs characterized by acute toxicosis and bleeding diathesis [6]. The disease has been previously reported in Africa, Spain, Portugal, France, Brazil and Cuba. Some characteristics suggest that this epizootic disease turns into a panzootic [1, 2]. ASF introduction and spread causes huge economic losses in the pig production industry [8]. Reliable and timely diagnosis is a key factor for measures taken to contain the infection. [10].

Cells, obtained *in vitro* from ASF-susceptible animals (*Sus scrofa*). They include cells derived from organs (porcine kidneys, testicles) and hematopoietic system (bone marrow, lymph node and spleen cells) [6, 8]. All mentioned primary cell cultures are susceptible to ASF virus in different ways, that's why not all cells are involved into virus reproduction. But methodically correct preparation of such cells turns them into an indispensable part of the research. Beside primary cell cultures, continuous cell cultures from different animals, including simians (Vero-V, CV-1) can be used for ASF diagnosis and virus isolation. But homologous objects and the most susceptible cells are the first choice [11–15].

The obtaining of fresh bone marrow cells and other primary objects is a labour-intensive process; that's why it was attempted to study the conditions of cell suspension storage at low and ultra-low temperatures and their effect on ASF virus reproduction when thawed.

In medical science and practice cryopreservation of bone marrow cells is widely used for transplantation practices [5]. Basic methodical approaches to this problem have been elaborated thanks to some fundamental studies. A wide range of cryoprotectants, used for cell cryopreservation, has been determined, like PEO-400, ethylene glycol, DMSO and etc. [3]. It is known that the freezing speed of bone marrow cells after crystallization must be very high in order to prevent intracellular crystallization, and that was taken into account in this study.

MATERIALS AND METHODS

Piglets, 2–4 month-old, 15 to 30 kg bw, originating from the Vladimir Oblast farms free from infectious diseases were used in the study.

After the piglets were decapitated, their tubular bones were isolated for bone marrow cell culture (BMCC) preparation [4, 7, 9] and spleens, testicles, lymph nodes and kidneys were aseptically removed [1]. Tissues were thoroughly ground and saline solution supplemented with antibiotics like benzylpenicillin, potassium/sodium salts, streptomycin, cefotaxime, gentamicin, metronidazole was added. 0,25% trypsin solution for porcine kidneys (PK) was used for trypsinization. For better washing cell suspension was placed into a thermoshaker for 30 minutes at t=37°C. Supernatant was poured into a sterile container containing fetal bovine serum (FBS, 10% of the composition). Fresh 0,25% trypsin solution for PK was added to the sediment and was placed again into a thermoshaker for 30 minutes at t=37°C. The supernatants were mixed in one container, gauze-filtered and centrifuged at 1000 rpm for 20 minutes. The sediment was resuspended in the medium supplemented with 10 IU/ml of heparin sodium; the latter facilitated the desintegration of conglomerates into separate cells. Then, in order to remove heparin sodium, the sediment was centrifuged again at 1000 rpm for 20 minutes. The sediment was resuspended in the medium, filtered using 70 µm mesh size SDL «Cell Strainer» and then diluted up to the appropriate concentration. Nutrient media, like Eagle's medium, semisynthetic medium, DMEM/F-12, containing 20% of FBS, were used for cell culture seeding. Cells were counted using both standard applied methods (counting in Goryaev's chamber) and in Countess™ automated cell counter (Invitrogen™, Korea). Primary cell cultures were seeded in plastic 96-well plates and 25 cm²-plastic flasks. Cell cultures were cultured in CO₂ incubator with 5% CO₂.

Porcine bone marrow was trypsinized in a similar way, but 0,25% trypsin solution was replaced by the mixture of trypsin solution (0,25%) and versene solution (0,02%) in 1:5 ratio in the amount of 50 ml for 450 ml of Eagle's medium.

Working suspension of porcine red blood cells was prepared for ASF virus hemadsorption assay. For this purpose 200 ml of piglet blood was collected to a sterile

Table 1
Selection of cell concentration for preparation of confluent monolayer in 25 cm² flasks and 96-well plates

Cell culture	Cell concentration in 1 ml	Amount of cell suspension, seeded in	
		flasks (S=25 cm ²)	96-well plates
BM	6–8 mln	10 ml	100 µl
PK	500 ths		
LN	6–8 mln		
PS	6 mln		
PT	500 ths–2 mln		

bottle containing glass beads and shaken for 30 minutes till the fibrin clots were formed. Then blood was filtered in a funnel using 4-layer sterile gauze. Filtered blood was then centrifuged at 1000 rpm for 10–15 minutes for serum detachment; then serum was collected to a separate container. Sedimented RBCs were washed three times with saline solution (50 ml each time) and then centrifuged again at 1000 rpm for 10–15 minutes. Sedimented RBCs were diluted with saline solution in 1:10 ratio and thus the master suspension was prepared. 50 µl/ml of gentamicin was added to the prepared suspension and was stored for a month at t=4°C. The master suspension was used for the preparation of RBC working solution in a following way: 9 ml of saline solution were added to 1 ml of suspension.

In this study porcine BMCC was infected with ASFV Odintsovo 02/14 isolate at the dose of 0,1–0,01 HAdU₅₀/cell. 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a cryoprotectant [3], 10% FBS was added. Porcine BMCC in 5,0×10⁶ cell/cm³ concentration was filled into 5,0 ml plastic tubes and stored at -70, -150 and -196°C in liquid nitrogen in Dewar flasks for 6 months. After 1, 2, 3, 4, 5, 6 months of storage porcine BMCCs were thawed at room temperature and diluted in Eagle's medium. Then the suspension was

Fig. 1. Bone marrow cells stained with acridine orange (0,01%), 24 hours post seeding

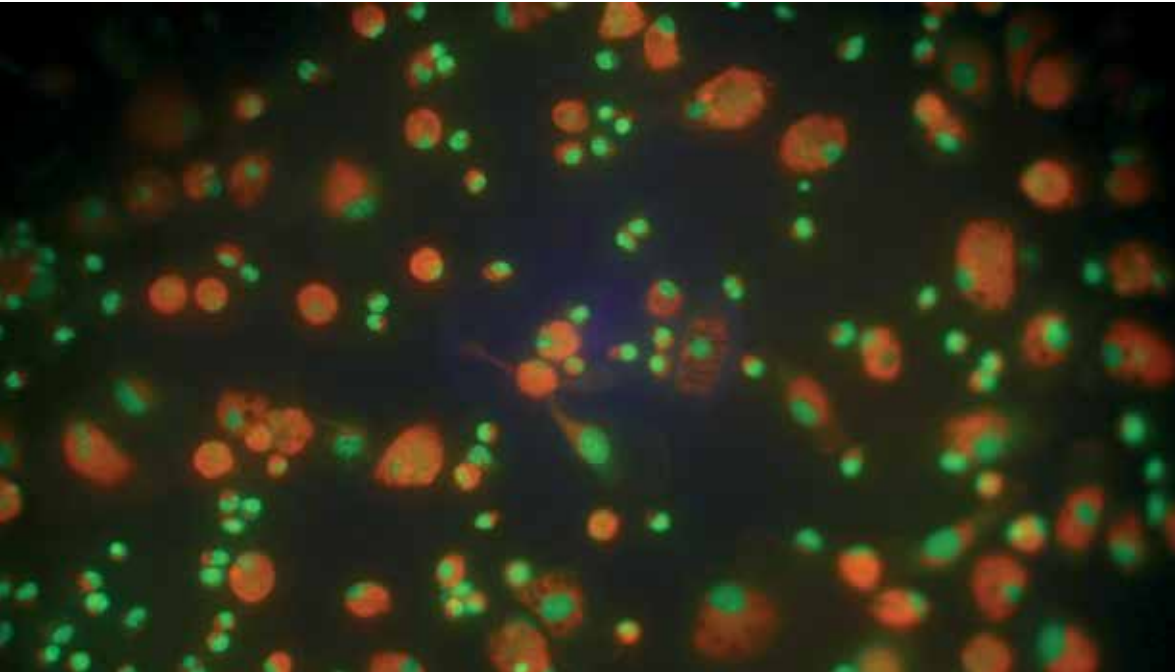


Table 2
Porcine BM cell viability and ASF virus titre when thawed after storage at -70°C

Storage period, months	Number of cells after thawing	% of viable cells	ASF virus titre, Lg HAdU ₅₀ /0,15 cm ³
1	4,5×10 ⁶	57	(3,2–3,86)±0,25
2	4,3×10 ⁶	30	
3	4,3×10 ⁶	28	
4	3,2×10 ⁶	7	
5	2,8×10 ⁶	0	
6	2,0×10 ⁶	0	

Table 3
Porcine BM cell viability and ASF virus titre when thawed after storage at -150°C

Storage period, months	Number of cells after thawing	% of viable cells	ASF virus titre, Lg HAdU ₅₀ /0,15 cm ³
1	4,4×10 ⁶	95	5,76±0,25
2	4,2×10 ⁶	94	
3	3,2×10 ⁶	91	
4	4,1×10 ⁶	54	
5	4,4×10 ⁶	39	
6	3,0×10 ⁶	37	

Table 4
Porcine BM cell viability and ASF virus titre when thawed after storage at -196°C

Storage period, months	Number of cells after thawing	% of viable cells	ASF virus titre, Lg HAdU ₅₀ /0,15 cm ³
1	1,7×10 ⁶	89	(4,66–4,87)±0,25
2	1,7×10 ⁶	85	
3	1,6×10 ⁶	82	
4	1,3×10 ⁶	80	
5	1,4×10 ⁶	80	
6	1,4×10 ⁶	72	

centrifuged at 1000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed, the sediment was dissolved in Eagle's medium and total amount of cells was counted as well as the percentage of viable cells among them. The sediment then was seeded in 96-well plates, 100 µl/well. In 48 hours, without any medium change, the porcine BMCC was infected with ASF virus. ASF virus hemadsorption activity in porcine BMCC was tested in 5–7 days.

RESULTS AND DISCUSSION

Cells derived from different organs (bone marrow, spleen, testicles, kidneys, lymph nodes), are different in size and demonstrate different polymorphism; that's why the optimal cell concentration was selected to obtain a confluent layer appropriate for virological study.

For the preparation of porcine BM cell culture 10 IU/ml of heparin sodium was shaken at t=37°C for 30 minutes in order to prevent hematopoietic stem cell aggregation during freezing. Other cell cultures, porcine spleen (PS), lymph nodes (LN), porcine testicles (PT) and porcine kidneys (PK) were similarly treated with heparin sodium.

Cell cultures were seeded in 25 cm² flasks and 96-well plates. Cell seed concentration and amounts are shown in Table 1.

Based on the data obtained during the experiments (Table 1) the highest cell concentration is needed for porcine BM, LN and PS cell seeding. In order to prepare a confluent monolayer, the amount of PK cells needed is 4 times less, and PT cell amount may vary from 500 thousand to 2 million. During the experiments cell monolayer was formed in 24–72 hours when such concentrations were used. The inoculation volume of cell suspension did not correlate with the type of cell suspension and was equal to 10 ml per S=25 cm² flask and 100 µl per one well of 96-well plate. Nutrient media in flasks and well seeded with porcine BM cells were changed every 48 hours and Eagle's media in flasks filled with PK, LN, PS and PT cells were changed every 48–72 hours. Eagle's medium also contained 20% of FBS.

BMCC monolayer was infected with ASFV Odintsovo 02/14 isolate at the dose of 0,1–0,01 HAdU₅₀/cell. ASF virus obtained in 5–7 days post infection was titrated in 96-well plates [4]. ASF virus titers were 6,5 to 7,0±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³.

Then sensitivity of BM cells to ASF virus stored for 1, 2, 3, 4, 5, 6 months at -70, -150 and -196°C was studied. The preservative agent was removed from cell suspension by centrifuging at 1000 rpm for 15 minutes. The obtained sediment was dissolved in the medium and seeded into 96-well plates, 100 µl/well, and the number and percentage of survived cells were calculated. In 48 hours porcine BMCC was infected with ASF virus. ASF virus hemadsorption activity was tested in 5–7 days. The results of ASF virus reproduction in porcine BMCC at three different storage temperatures are shown in Tables 2–4.

The results of the experiments (Table 2) showed that the number of viable porcine BM cells stored for 5–6 months at 70°C after thawing is 0. The percentage of viable cells stored for 1–4 months was within 57–7%. ASF virus hemadsorption titre in porcine BBMC was within 3,2±0,25–3,86 ±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³.

As it is seen from the results in Table 3, the percentage of viable porcine BM cells declined from 95 to 37% with the increase in storage time; ASF virus hemadsorption titre was 5,76±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³.

Based on the data obtained (Table 4) it was determined that the number of viable cells stored at -196°C did not significantly varied during 6 months and was within 72–89%. Number of cells after thawing was from 4,66±0,25 to 4,87±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³.

The conducted study demonstrated that cell concentration during primary freezing of cell suspension was 5,0×10⁶ cell/cm³, and just in a month the number of cells was 3 times smaller and this level was maintained during the whole period of the study.

This means, that when porcine MB cells are put into storage at -196°C, it is necessary to take the maximum possible cell concentration.

Table 2–4 show that independent from the storage temperature, porcine BM cells formed a monolayer in plate wells sufficient for ASF virus titration. ASF virus hemadsorption titre in porcine BMCC tested in cells stored at -150°C was 5,76±0,25 HAdU₅₀/0,15 cm³. Cell viability percentage at -196°C was as high as during the storage at -150°C, but the virus titre decreased to (4,66–4,87)±0,25 HAdU₅₀/0,15 cm³.

In the course of further tests aimed at the study of porcine BM cell morphology using fluorescence micros-

copy (eye-piece lens×10; objective lens×60) cell polymorphism was detected.

Fig. 1 shows that the specimen contained two types of cells: bone marrow cells looking like small cells with green nuclei and large adherent stromal cells.

After storing porcine BMCC at -196°C (Fig. 2) during three months the number of stromal cells became smaller and a big amount of small porcine BM hematopoietic stem cells with green nuclei were found to be in extracellular matrix fibers.

After 6 months of porcine BM cell suspension storage in liquid nitrogen at -196°C cell viability was pretty high, i.e. 72% of viable cells (Fig. 3).

This means the adhesivity of stromal cells after long-term storage (observation period is 6 months) decreases less than the adhesivity of porcine BM hematopoietic stem cells.

CONCLUSIONS

1. The studies proved that when preparing porcine BM, PS and LN cells the addition of 10 IU/ml of heparin sodium prevents their aggregation. After shaking using thermoshaker for 30 minutes at t=37°C not more than 1–2 conglomerates were seen in the microscope field of view. (1×10 magnification).

2. Porcine BMCC was better preserved at -150°C and -196°C for 5–6 months; ASF virus hemadsorption titres were 5,76±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³ and (4,66–4,87)±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³, respectively.

3. The storage of porcine BMCC at -70°C was limited to 4 months; the percentage of viable cells after thawing was within 57–7%; herewith ASF virus titre was (3,2–3,86)±0,25 lg HAdU₅₀/0,15 cm³.

REFERENCES

1. Dyakonov L.P. Animal cell in culture. – M., 2009. – 120 p.
2. Makarov V.V., Sukharev O.I., Litvinov O.B. *Ornithodoros* ticks – African swine fever virus system: Bioecology, virology, epidemiology // Veterinarnaya Patologiya. – 2011. – № 3. – P. 18–19.
3. Manin B.L. Cryopreservation and culturing of cell lines: two phases of biological object existence // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health. – Vladimir, 2008. – Vol. 6. – P. 390–405.
4. Methodical recommendations for preparation of porcine bone marrow cell culture for study of ASFV isolate cultural properties / A.A. Varentsova, I.Yu. Zhukov, V.L. GavriloVA [et al.]; FGBI «ARRIAH». – Vladimir, 2014. – 14 p.
5. Low-temperature preservation of bone marrow / N.S. Pushkar, A.M. Belous, A.A. Tsutsayeva [et al.]. – Kiev: Naukova Dumka, 1976 – 288 p.
6. Optimization of bone marrow cell culture preparation conditions / I.Yu. Zhukov, I.V. Shevchenko, A.A. Varentsova [et al.] // The IV International scientific workshop for young scientists «Youth and Science XXI» 16–20.09.14.: Proceedings. Vol. 1. – Ulyanovsk: USAA named after P.A. Stolypin, 2014. – P. 46–52.
7. Optimization of storage conditions for porcine alveolar macrophages and bone marrow cells at low temperatures / O.S. Puzankova, I.Yu. Zhukov, A.A. Varentsova [et al.] // The IV International scientific workshop for young scientists «Youth and Science XXI» 16–20.09.14.: Proceed-

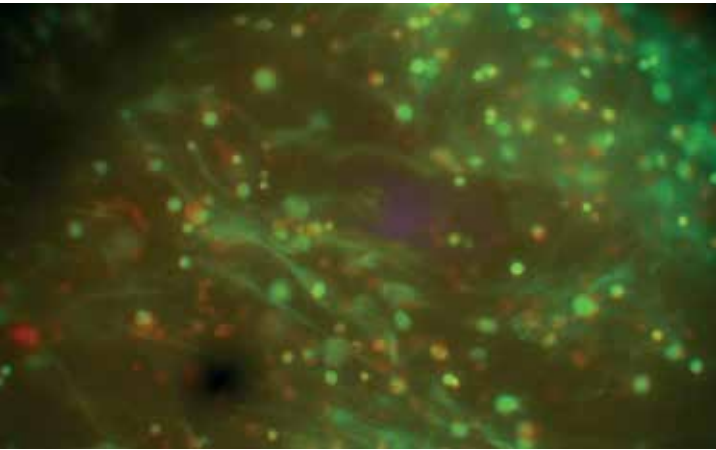


Fig. 2. Bone marrow cells stained with acridine orange (0,01%), post 3 months of storage at -196°C in liquid nitrogen

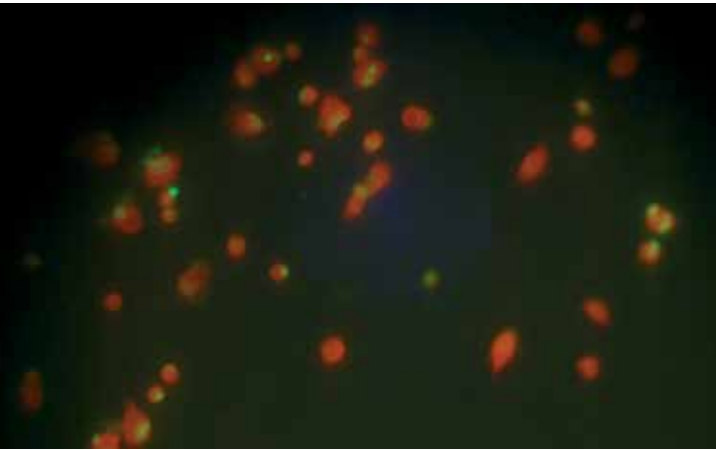


Fig. 3. Bone marrow cells stained with acridine orange (0,01%), post 6 months of storage at -196°C in liquid nitrogen

ings. Vol. 1. – Ulyanovsk: USAA named after P.A. Stolypin, 2014. – P. 103–111.
8. Virus culture methods. Cell culture. – URL: medical-planet.su/1372/html (reference date: 20.11.15).
9. Uchitel I.Ya. Role of macrophages in immunity. – M.: Meditsina, 1978. – 200 p.
10. Shishkov V.P. Veterinary medicine encyclopedia. – M.: Sovetskaya Entsiklopedia, 1981. – P. 247–248.
11. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Interaction entry of African swine fever virus with macrophages // Virus Res. – 1990. – Vol. 17, № 2. – P. 93–104.
12. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. – 1989. – Vol. 168, № 2. – P. 393–398.
13. Alcamí A., Carrascosa A.L., Vinuela E. The entry of African swine fever virus into Vero cells // Virology. – 1989. – Vol. 171, № 1. – P. 68–75.
14. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into Vero cells does not require virus replication / A.L. Carrascosa, M.J. Bustos, M.L. Nogal [et al.] // Virology. – 2002. – Vol. 294, № 2. – P. 372–382.
15. Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages / S. Basta, H. Gerber, A. Schaub [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2010. Vol. 140, №1–2. – P. 9–17.