

**Table 7**  
Results of Sensitivity and Specificity Tests for the Developed Method Used for Experimental Chicken Sera

ARRIAH	IDEXX		Total
	Positive	Negative	
Positive	41	1	42
Negative	0	26	26
Total	41	27	68

### CONCLUSION

The developed test system made it possible to get reproducible results, demonstrated high sensitivity and specificity in comparison with the commercial kit both when testing chicken sera from the RF poultry establishments and after experimental infection with ALV-J/CLB-908U strain.

### REFERENCES

- Lazareva S.P., Mudrak N.S., Chvala I.A. Development of immunospecific components for diagnosis of subgroup J avian leucosis// Innovations in Agro-industrial complex: Collection of Papers of the 6<sup>th</sup> International Research Conference of Teachers, Young Scientists, Post-Graduate Students and Students. – Moscow, 2014. – P. 156–159.
- Plotnikov V.A. Molecular and genetic analysis and biological characteristics of avian leucosis virus field isolates circulating in the Russian Federation: PhD thesis, Candidate of Science (Biology).- Moscow, 2014, -146 p.

- Spread of ALV on poultry farms of the Russian Federation/ T.A. Timofeyeva [et al.] // Proceedings of the International Jubilee Scientific Conference "New Trends in Epizootology, Diagnosis and Prevention of Infectious and Non-Infectious Avian Diseases in Poultry Industry"- St. Petersburg, 2004, P. 68–69.
- A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens / L.N. Payne [et al.] // J. Gen. Virol. – 1991. – Vol. 72. – P. 801–807.
- Fadly A.M. Isolation and identification of avian leukosis viruses: a review // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29, № 6. – P. 529–535.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Payne L.N., Nair V. The long view: 40 years of avian leukosis research // Avian Pathol. – 2012. – Vol. 41, № 1. – P. 1–9.



### ФГБУ «ВНИИЗЖ» ПРОИЗВОДИТ

#### Вакцину для профилактики болезни Марека «Маривак 1+3»

В результате проведенных научно-исследовательских работ было оптимально подобрано и обосновано соотношение штаммов в препарате. Изучены и доказаны иммунологические и протективные свойства вакцины, обусловленные синергическим действием вирусов, безопасность для окружающей среды и человека.

Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является отечественным аналогом зарубежных вакцин против болезни Марека из 1 и 3 серотипов вируса, содержащим новую комбинацию известных штаммов.

На сегодняшний день проведен полный комплекс доклинических исследований и клинических испытаний вакцины «Маривак 1+3». На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является безвредным препаратом, обладает высокой иммуногенной активностью против высоковирулентных (vv) и высоковирулентных плюс (vv+) штаммов вируса БМ и может успешно использоваться

пользоваться в ветеринарной практике для специфической профилактики БМ. Однократная вакцинация способствует формированию напряженного иммунитета, который сохраняется на протяжении всей жизни привитой птицы и предохраняет от болезни Марека. Вакцина стабильна на протяжении 24 месяцев при соблюдении требований к хранению.

Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» зарегистрирована и разрешена к применению в Российской Федерации.

#### Справка

Болезнь Марека (БМ) — высококонтагиозное, лимфопрлиферативное, злокачественное вирусное заболевание птиц. БМ характеризуется образованием единичных и множественных опухолей во внутренних органах, коже, мышцах, а также изменениями центральной и периферической нервной системы. Вирус болезни Марека (ВБМ) повреждает иммунокомпетентные органы (селезенку, тимус, клоакальную сумку) и обладает, таким образом, иммунодепрессивной активностью, что приводит к снижению общей резистентности птиц и повышению их чувствительности к другим болезням. Важным средством предупреждения БМ и снижения потерь от заболевания является вакцинопрофилактика. Для специфической профилактики используют вакцины трех типов: из аттенуированных штаммов ВБМ (серотип 1), из природноослабленного непатогенного ВБМ (серотип 2) и штаммов вируса герпеса индеек (серотип 3).

УДК 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

# ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА И ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ИЗОЛЯТОМ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ ПОДТИПА В

М.А. Волкова<sup>1</sup>, П.С. Ярославцева<sup>2</sup>, В.Ю. Сосипаторова<sup>3</sup>, Т.И. Ерошина<sup>4</sup>, И.А. Чвала<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: volkovama@arriah.ru

<sup>2</sup> младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: yarovslavtseva@arriah.ru

<sup>3</sup> ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

<sup>4</sup> ведущий технолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

<sup>5</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

Экспериментальное заражение 7-суточных цыплят-бройлеров изолятом метапневмовируса птиц подтипа В вызывало развитие слабовыраженных признаков поражения респираторной системы и опухание инфраорбитальных синусов через 5–15 суток после инфицирования. Наблюдали изменения в тканях трахеи, носовых ходов и первичных лимфоидных органов. Наличие генома метапневмовируса птиц установлено методом ОТ-ПЦР-РВ в органах верхнего отдела респираторного тракта, инфраорбитальных синусах и гардеровой железе в период 2–12 суток после заражения.

Иммунный ответ характеризовался образованием гуморальных и локальных антител через 7–21 сутки после инфицирования. Через 3 суток после заражения регистрировали увеличение процента CD8a+ T-клеточной субпопуляции в крови и селезенке инфицированных цыплят.

Ключевые слова: метапневмовирус птиц, клеточный и гуморальный иммунитет, патогенез.

UDC 619:616.98:578.831.3:636.5:616-073

# STUDIES OF PATHOGENESIS AND IMMUNE RESPONSE AT EXPERIMENTAL INFECTION OF BROILER CHICKS WITH AVIAN METAPNEUMOVIRUS SUBTYPE B

M.A. Volkova<sup>1</sup>, P.S. Yaroslavtseva<sup>2</sup>, V.Yu. Sosipatorova<sup>3</sup>, T.I. Eroshina<sup>4</sup>, I.A. Chvala<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: volkovama@arriah.ru

<sup>2</sup> Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: yarovslavtseva@arriah.ru

<sup>3</sup> Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

<sup>4</sup> Leading Technologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

<sup>5</sup> Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

### SUMMARY

Experimental infection of 7-day-old chicks with the isolate of avian metapneumovirus Subtype B induced mild signs of respiratory infection and swelled infraorbital sinuses in 5–15 days post infection. Lesions in tissues of trachea, nasal passages and primary lymphoid organs were reported. Using real-time RT-PCR avian metapneumovirus genome was detected in the upper part of the respiratory tract, infraorbital sinuses and Harderian gland within 2–12 days post infection.

The immune response was characterized by formation of humoral and local antibodies in 7–21 days post infection. In 3 days post infection increased percentage of CD8a+ T-cell subpopulation was reported in blood and spleen of the infected chicks.

Key words: avian metapneumovirus, cell-mediated and antibody-mediated immunity, pathogenesis.

**ВВЕДЕНИЕ**

Метапневмовирус птиц (МПВ) — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Paramyxoviridae*, род *Metapneumovirus*, вид *Avian Metapneumovirus*. Впервые был выявлен в 1978 г. в Южной Африке.

МПВ птиц является возбудителем высококонтагиозного респираторного заболевания индеек, кур и других видов птиц [2, 4]. Заболевание характеризуется воспалительными процессами верхних дыхательных путей у индеек, у цыплят-бройлеров может вызывать синдром опухшей головы, у кур-несушек преимущественно приводит к снижению яичной продуктивности [10, 14]. На основании антигенных и генетических (по нуклеотидному составу гена белка прикрепления G) различий выделяют 4 подтипа вируса: А, В, С и D [8, 12]. Вирусы подтипов А и В были выявлены в Африке, Азии, Южной и Северной Америке, Европе, России. Подтип С был выделен от индеек с респираторными признаками болезни в США в 1996 г., а подтип D — во Франции и Корее [1–3, 6, 7, 9–11, 13].

МПВ птиц репродуцируется в тканях верхнего отдела респираторного тракта птиц (носовых полостей, гортани, трахеи) и конъюнктивы в течение 7–10 суток после инфицирования [2, 4]. Регистрировали случаи выявления вируса в легких и яйцеводах. Период клинического проявления болезни обычно не превышает 7–12 суток. Поскольку МПВ птиц вызывает в основном локальную инфекцию, ограниченную пределами респираторного тракта, решающую роль при МПВ-инфекции играет местный и клеточный иммунный ответ [5, 9, 13, 14].

Гуморальный иммунный ответ является более важным для взрослых птиц, МПВ птиц способен вызвать иммуносупрессию, увеличивающую предрасположенность птиц к вторичным инфекциям, и может снижать эффективность вакцинации против других заболеваний [9, 14].

В настоящее время в большей степени изучены и представлены в научной литературе патогенез и иммунный ответ индеек, инфицированных МПВ птиц, а патогенез и иммунный ответ цыплят после заражения изолятами МПВ птиц, выделенными от кур, еще недостаточно исследованы.

В связи с этим целью работы являлось изучение патогенеза и иммунного ответа при экспериментальном заражении цыплят-бройлеров изолятом МПВ птиц подтипа В.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Вирус.** Для заражения использовали изолят МПВ птиц подтипа В (aMPV/B/22/2010), полученный из патологического материала от цыплят-бройлеров одной из птицефабрик Белгородской области РФ, в виде культуральной суспензии 8 пассажа на первично трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК).

**Эксперимент на цыплятах.** 7-суточные цыплята-бройлеры, не имеющие антител к МПВ птиц, были разделены на две группы по 30 голов в каждой. Опытной группе вводили культуральную жидкость, содержащую МПВ птиц подтипа В, интраназально и закапыванием на конъюнктиву глаза в дозе 6,1 Ig ТЦД<sub>50</sub>/0,4 мл на цыпленка. Обе группы цыплят содержались отдельно в изолирующих боксах. На 2, 5, 8, 12, 15, 20 суток после инфицирования отбирали ротоглоточные смывы

и проводили убой 4 цыплят из опытной группы и 4 неинфицированных цыплят для патологоанатомического исследования и отбора проб биоматериала (кровь, Гардерева железа, решетчатая кость, синус, трахея, легкое, селезенка, тимус). До заражения и через 7, 14 и 21 сутки после него проводили отбор проб крови, слезной жидкости и ротоглоточных смывов у опытных и контрольных цыплят для выявления специфических к МПВ птиц антител методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**ИФА.** Выявление антител к МПВ птиц проводили с использованием набора для определения антител к МПВ птиц иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении согласно инструкции производителя (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Результат реакции считали положительным при величине титра антител 392 и выше (за титр антител принимали величину, обратную разведению сыворотки).

Определение титра антител к МПВ птиц в слезной жидкости и трахеальных смывах цыплят проводили в непрямом варианте ИФА с использованием планшетов (Nunc, MaxiSorp, Дания), сенсibiliзированных антигеном МПВ птиц в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5), по стандартному протоколу. Учет реакции проводили на спектрофотометре-ридере Sunrise Basic (Tecan, Австрия) при длине волны 405 нм с использованием компьютерной программы «СИНКО-ИФА». Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

**ОТ-ПЦР-РВ** проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с использованием ферментов AMV Reverse Transcriptase и Go Taq<sup>+</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega, США), праймеров и ДНК-зонда для выявления МПВ птиц подтипа В.

**Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов.** Выделение лимфоцитов из периферической крови и лимфоидных органов кур проводили по стандартной методике с использованием Ficoll-Paque<sup>™</sup> PLUS (Amersham Biosciences, Швеция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD45-FITC, CD4-PE, CD8α-PE, CD3-PE (Southern Biotech, США). Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

**Гистологическое исследование.** Кусочки органов размером 0,5×0,5×0,5 см фиксировали 4% раствором формалина в 80% растворе этилового спирта в течение 48 ч и заключали в парафин. С парафиновых блоков получали срезы толщиной 5–7 мкм (микротом Microm HM340E, Германия). Готовые препараты окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной окраски. Микроскопическое исследование препаратов производили на инвертированном конфокальном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E C2+ (Япония).

**Статистический анализ результатов.** Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0 (Stat Soft, Inc., США). Существенность различий результатов цитофлуориметрических исследований проб от цыплят из инфицированной и контрольной групп определяли с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

У экспериментально зараженных цыплят наблюдалось угнетенное состояние, носовые истечения и одностороннее либо двустороннее опухание инфраорбитальных синусов в период с 5 по 15 сутки после заражения.

При патологоанатомическом вскрытии наблюдали точечные кровоизлияния в трахее (8, 12 и 15 сутки), отечность инфраорбитальных синусов (8, 12 и 15 сутки), кровенаполненность легких (15 сутки), изменение окраски тимуса (12 и 15 сутки после заражения).

При гистологическом исследовании носовых ходов были выявлены частичное разрушение слизистого слоя, утолщение подслизистого слоя с очагами геморрагий и редукция железистых клеток экспериментально зараженных птиц (рис. 1).

В трахее зараженных птиц наблюдали частичную десквамацию реснитчатого эпителия и умеренное утолщение подслизистого слоя за счет инфильтрации лимфоцитов (рис. 2). При гистологическом исследовании тимуса в мозговом слое наблюдали разрастание ретикулярной структуры с тельцами Гассала и уменьшение количества миоидных клеток (рис. 3).

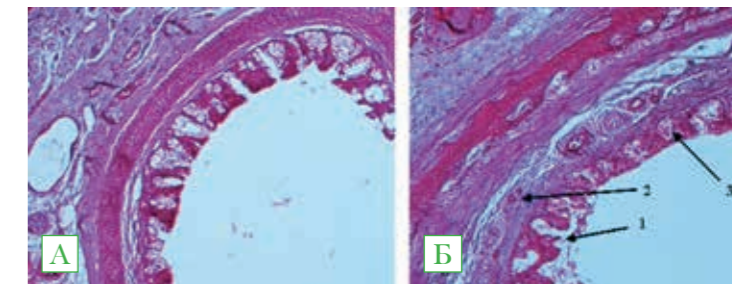
При исследовании методом ОТ-ПЦР-РВ геном МПВ птиц подтипа В был обнаружен в ротоглоточных смывах зараженных цыплят в период со 2 по 8 сутки после заражения (табл. 1); в трахее, тканях носовых полостей, инфраорбитальных синусах и гардерева железа — на 5, 2–12, 5–8 и 5 сутки соответственно.

В течение эксперимента в пробах легких геном МПВ птиц не выявили.

У контрольных цыплят клинических признаков, макро- и микроизменений в органах и тканях не выявили. При исследовании проб органов от контрольной птицы в ПЦР получены отрицательные результаты.

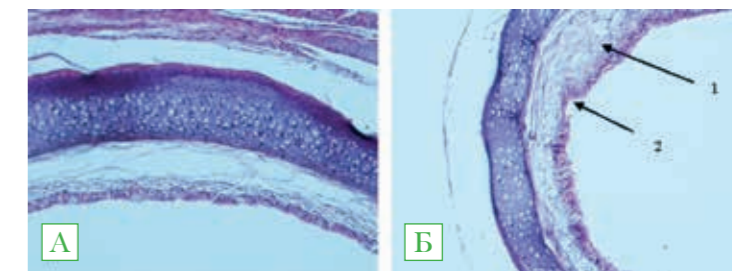
При исследовании сывороток крови в ИФА специфические антитела к МПВ птиц выявляли, начиная с 7 суток после заражения, при этом средний титр антител по группе увеличился с 576 до 1732, а средний титр положительных проб — с 758 до 2832 (табл. 2). Антитела были выявлены у 7, 5 и 6 цыплят из опытной группы, соответственно на 7, 14 и 21 сутки. У цыплят неинфицированной группы специфические антитела в крови не обнаружили.

Полученные данные об увеличении выработки гуморальных антител при МПВ-инфекции согласуются с ре-



**Рис. 1.** Решетчатая кость цыпленка через 12 суток после начала эксперимента (окраска гематоксилин-эозин, об. 10, ок. 10)

А — контрольная группа; Б — опытная группа; 1 — слизистый слой, 2 — подслизистый слой с очагами геморрагий, 3 — железистые клетки.



**Рис. 2.** Трахея цыпленка через 12 суток после начала эксперимента (окраска гематоксилин-эозин, об. 15, ок. 10)

А — контрольная группа; Б — опытная группа; 1 — реснитчатый эпителий, 2 — подслизистый слой.

зультатами Rautenschlein S. и соавт., которые с 10 суток после окулоназального заражения 16-суточных цыплят-бройлеров двумя вирулентными изолятами подтипов А и В регистрировали выработку специфических антител в ИФА с пиком в 24–28 суток после заражения [14].

Местный антительный ответ обнаруживали у меньшего количества инфицированных цыплят из группы. Специфические антитела класса А (IgA) были обнаружены в ротоглоточных смывах зараженных цыплят через 7 и 14 суток после инфицирования, антитела класса М (IgM) и G (IgG) — через 7–21 сутки (рис. 4). Пик образо-

**Таблица 1**  
Результаты выявления генома МПВ птиц подтипа В методом ОТ-ПЦР-РВ в ротоглоточных смывах и органах респираторного тракта зараженных цыплят

Проба	Период после заражения, сутки				
	2	5	8	12	15
Ротоглоточные смывы	2/10*	8/10	8/10	0/10	0/10
Трахея	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3
Ткани носовых полостей	2/3	3/3	3/3	1/3	0/3
Легкие	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Синус	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3
Гардерева железа	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3

\* количество проб, в которых выявлен геном МПВ птиц/общее количество проб.

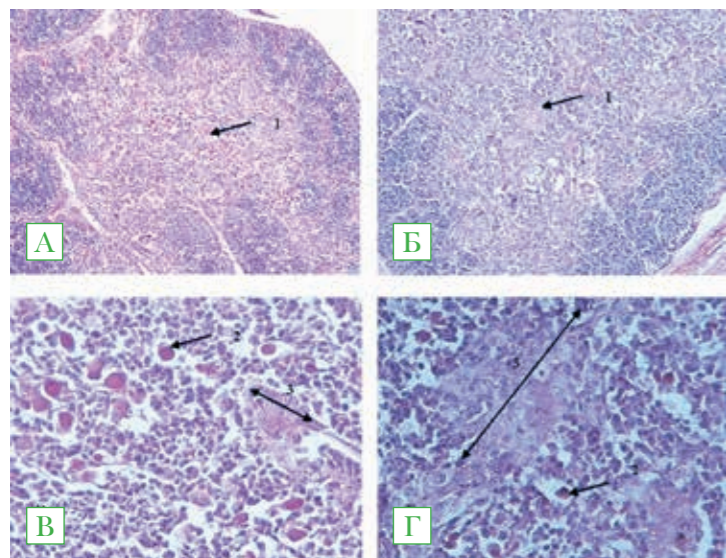


Рис. 3. Тимус цыпленка через 12 суток после начала эксперимента (окраска гематоксилин-эозин)

А — контрольная группа, об. 10, ок. 10; Б — опытная группа, об. 10, ок. 10; В — контрольная группа, об. 40, ок. 10; Г — опытная группа, об. 40, ок. 10; 1 — тельца Гассалья, 2 — миоидные клетки, 3 — ретикулярная структура.

В течение 2–15 суток после заражения определили снижение количества CD4+ Т-лимфоцитов (в среднем по группе) в крови инфицированных цыплят в 1,6 раза, а контрольных цыплят — в 1,2 раза. Через 20 суток после заражения средний уровень CD4+ в крови цыплят обеих групп существенно не отличался. Количество цитотоксических клеток (CD8α+) в крови инфицированных цыплят (в среднем по группе) через 2, 8, 15 и 20 суток после заражения было больше, чем у контрольных птиц, в 1,8–1,5 раза. В селезенке инфицированных цыплят наблюдали более низкий уровень Т-хелперов через 8–12 суток после заражения по сравнению с контрольными цыплятами (в среднем в 1,5–1,4 раза), сопровождающийся увеличением относительного количества цитотоксических лимфоцитов (в 1,2–1,3 раза больше, чем у контрольных цыплят).

При исследовании иммунного фенотипа клеток тимуса регистрировали общую динамику к снижению относительного количества CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в обеих группах через 8 суток после заражения и увеличение к концу опыта.

Таким образом, клеточный иммунный ответ у цыплят после заражения МПВ птиц характеризовался существенным увеличением уровня цитотоксических лимфоцитов в крови и селезенке. Усиление функциональной активности Т-лимфоцитов при МПВ-инфекции было также показано в работах других авторов [9, 14].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

При экспериментальном заражении изолят МПВ птиц подтипа В вызывал у цыплят-бройлеров респираторное заболевание с характерными для данной инфекции клиническими и патологическими изменениями на 5–15 сутки после инфицирования. Геном МПВ птиц подтипа В был обнаружен методом ОТ-ПЦР-РВ в ротоглоточных смывах и органах (трахея, ткани носовых полостей, инфраорбитальный синус, гардерева железа) инфицированных птиц со 2 по 12 сутки после заражения.

У зараженных цыплят отмечали увеличение относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов в крови и селезенке. Специфические антитела к МПВ птиц обнаружены в крови 50–70% инфицированных цыплят, начиная с 7 суток после заражения. Местный иммунный ответ характеризовался выработкой антител трех классов А, М и G в ротоглоточных смывах (у 20–50% цыплят) и слезной жидкости (у 10–50% цыплят) с 7 по 21 сутки после заражения.

вания IgM и IgA регистрировали через 7 суток, а IgG через 14 суток после инфицирования.

В слезной жидкости зараженных цыплят были выявлены преимущественно антитела класса IgM через 7–21 сутки после заражения. IgG выявляли в более низких титрах также через 7–21 сутки после заражения, а IgA был обнаружен только у одного цыпленка через 14 суток после инфицирования (рис. 4). Меньшая длительность и интенсивность местного иммунного ответа, по сравнению с гуморальным ответом при экспериментальном заражении цыплят-бройлеров МПВ птиц, была отмечена также другими авторами, которые связывали это с возможностью многократного инфицирования птиц МПВ в течение периода выращивания [14]. У цыплят контрольной группы специфические антитела к МПВ птиц в ротоглоточных смывах и слезной жидкости не обнаруживали.

Была проведена оценка клеточного иммунного ответа цыплят после заражения (рис. 5).

Таблица 2  
Результаты выявления антител к МПВ птиц в ИФА

Группа	Период после заражения, сутки			
	0	7	14	21
Контроль	266±56 <sup>а</sup> 0/6 <sup>б</sup>	281±52 0/6	199±50 0/6	190±49 0/6
Опыт		576±174 758±215 <sup>а</sup> 7/10	1195±604 2288±1022 5/10	1732±861 2832±1272 6/10

<sup>а</sup> средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

<sup>б</sup> средний положительный титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего;

<sup>с</sup> отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Выявление и типирование метапневмовирусов птиц в Российской Федерации / З.Б. Хлебовец, А.С. Пронин, И.А. Борисова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — 2007. — Т. 5. — С. 317–324.
2. Лазуткина Е.А., Бессарабов Б.Ф. Клинические признаки, патологоанатомические и гистоморфологические изменения при синдроме опухшей головы у цыплят-бройлеров // Материалы III междунар. вет. конгр. по птицеводству. — М., 2007. — С. 111–116.
3. Никонова З.Б. Филогенетический анализ изолятов метапневмовирусов птиц, выявленных в России и странах ближнего зарубежья в 2005–2011 гг. / З.Б. Никонова, Н.Г. Зиняков, Н.А. Перевозчикова // Ветеринария и кормление. — 2012. — № 5. — С. 34–36.
4. Cook J.K.A. Avian rhinotracheitis // Rev. Sci. Tech. OIE. — 2000. — Vol. 19 (2). — P. 602–613.
5. Effects of cyclosporine A induced T-lymphocyte depletion on the course of avian metapneumovirus (aMPV)

infection in turkeys / D. Rubbenstroth, T.S. Dalgaard, S. Kothlow [et al.] // Dev. Comp. Immunol. — 2010. — Vol. 34. — P. 518–529.

6. Ganapathy K. Avian metapneumovirus – an elusive pathogen of chickens (Part 1) // World Poultry. — 2007. — Vol. 23. — P. 36–37.

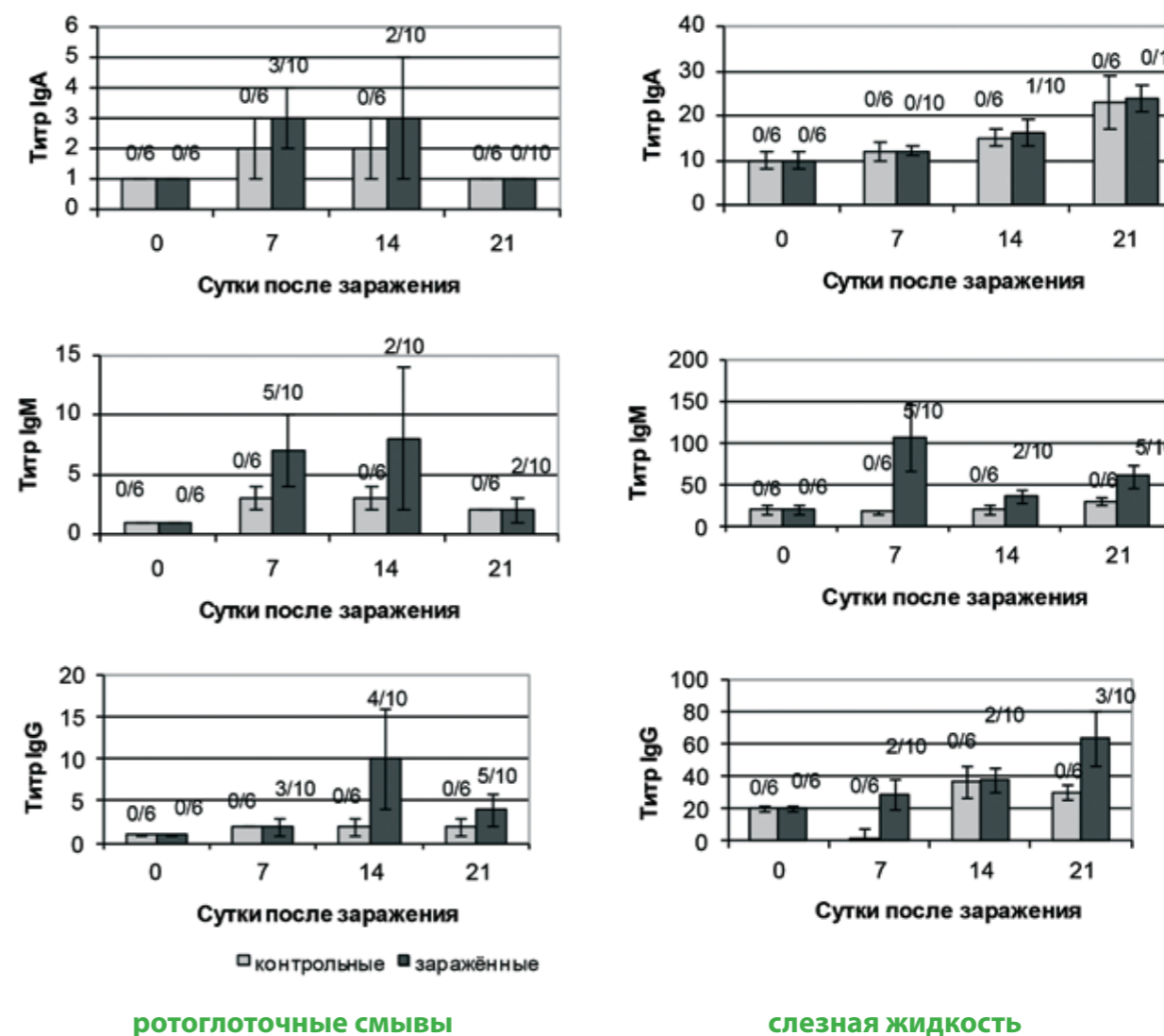
7. Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea / J. Kwon, H. Lee, S. Jeong [et al.] // J. Vet. Sci. — 2010. — Vol. 11. — P. 59–66.

8. Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus / O. Guionie, D. Toquin, E. Sellal [et al.] // J. Virol. Methods. — 2007. — Vol. 139. — P. 150–158.

9. Liman M., Rautenschlein S. Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2007. — Vol. 115. — P. 273–285.

Рис. 4. Результаты выявления антител к МПВ птиц в ротоглоточных смывах и слезной жидкости инфицированных и контрольных цыплят

Значения представлены как средний титр антител по группе ± стандартная ошибка среднего; значения над столбцами диаграммы показывают отношение количества положительных проб к общему количеству исследованных проб в группе.



УДК 619:576.34:57.082.26

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ВНК-21/2-17

М.Н. Гусева<sup>1</sup>, Д.В. Михалишин<sup>2</sup>, А.А. Шишкова<sup>3</sup>, Д.С. Большаков<sup>4</sup>, Б.Л. Манин<sup>5</sup>, М.А. Шевченко<sup>6</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: guseva\_mn@arriah.ru

<sup>2</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shishkova@arriah.ru

<sup>4</sup> старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

<sup>5</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

<sup>6</sup> аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko\_ma@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты исследований оптимизации аминокислотного состава питательных сред, предназначенных для суспензионного культивирования клеток ВНК-21-2/17, путем изменения количества аминокислот, входящих в них.

Установили, что интенсивность прироста в контрольной и опытной питательной среде была 5,6; динамика роста клеток также была одинаковой.

Утилизация различных аминокислот в питательной среде происходила по-разному. Больше всего клетки потребляли глутамина, серина, тирозина, метионина (до 90, 55, 40 и 60% соответственно).

Был отмечен рост аланина (от 10% в контроле и до 60% в опыте). Количество триптофана и глутаминовой кислоты оставалось постоянным. Утилизация глицина, треонина, изолейцина проходила интенсивно первые 24 ч (7–13%, 10–18%, 34–41% соответственно в контроле — опыте). Затем концентрация несколько увеличивалась (на 7–45%, на 16–21%, на 20–50% соответственно в контроле — опыте).

При репродукции ящура в клетках, выросших в опытной и контрольной среде, значимых различий в выходе иммуногенных компонентов вируса не наблюдали.

Ключевые слова: клетки ВНК-21/2-17, аминокислоты, аминокислотный состав, гидролизат белков крови, питательная среда.

UDC 619:576.34:57.082.26

## OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR ВНК-21/2-17 SUSPENSION CULTURE

M.N. Guseva<sup>1</sup>, D.V. Mikhailishin<sup>2</sup>, A.A. Shishkova<sup>3</sup>, D.S. Bolshakov<sup>4</sup>, B.L. Manin<sup>5</sup>, M.A. Shevchenko<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: guseva\_mn@arriah.ru

<sup>2</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shishkova@arriah.ru

<sup>4</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

<sup>5</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

<sup>6</sup> post-graduate student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shevchenko\_ma@arriah.ru

### SUMMARY

The paper demonstrates results of the research aimed at optimization of amino acid composition of the nutrient media used for ВНК-21/2/17 suspension cultivation by change of amino acid amount in such media.

Growth level in the control and tested media amounted to 5.6; cell growth dynamics was also similar.

In-media utilization of different amino acids was different. The cells mostly consumed glutamin, serine, tyrosine, methionin (up to 90%, 55%, 40% and 60%, respectively).

Growth of alanine level was reported (from 10% in the control sample and up to 60% in the test sample). Amount of tryptophan and glutamic acid remained stable. Glycine, threonine, isoleucine were actively utilized within the first 24 hours (7–13%, 10–18%, 34–41%, respectively in the control experiment). Hereafter, the concentration slightly increased (by 7–45%, by 16–21%, by 20–50%, respectively in the control experiment).

During the FMDV reproduction in the cells grown in the test and control media no significant differences in the yield of immunogenic virus components were reported.

Key words: ВНК-21/2-17 cells, amino acids, amino acid composition, blood-derived protein hydrolysate, nutrient medium.

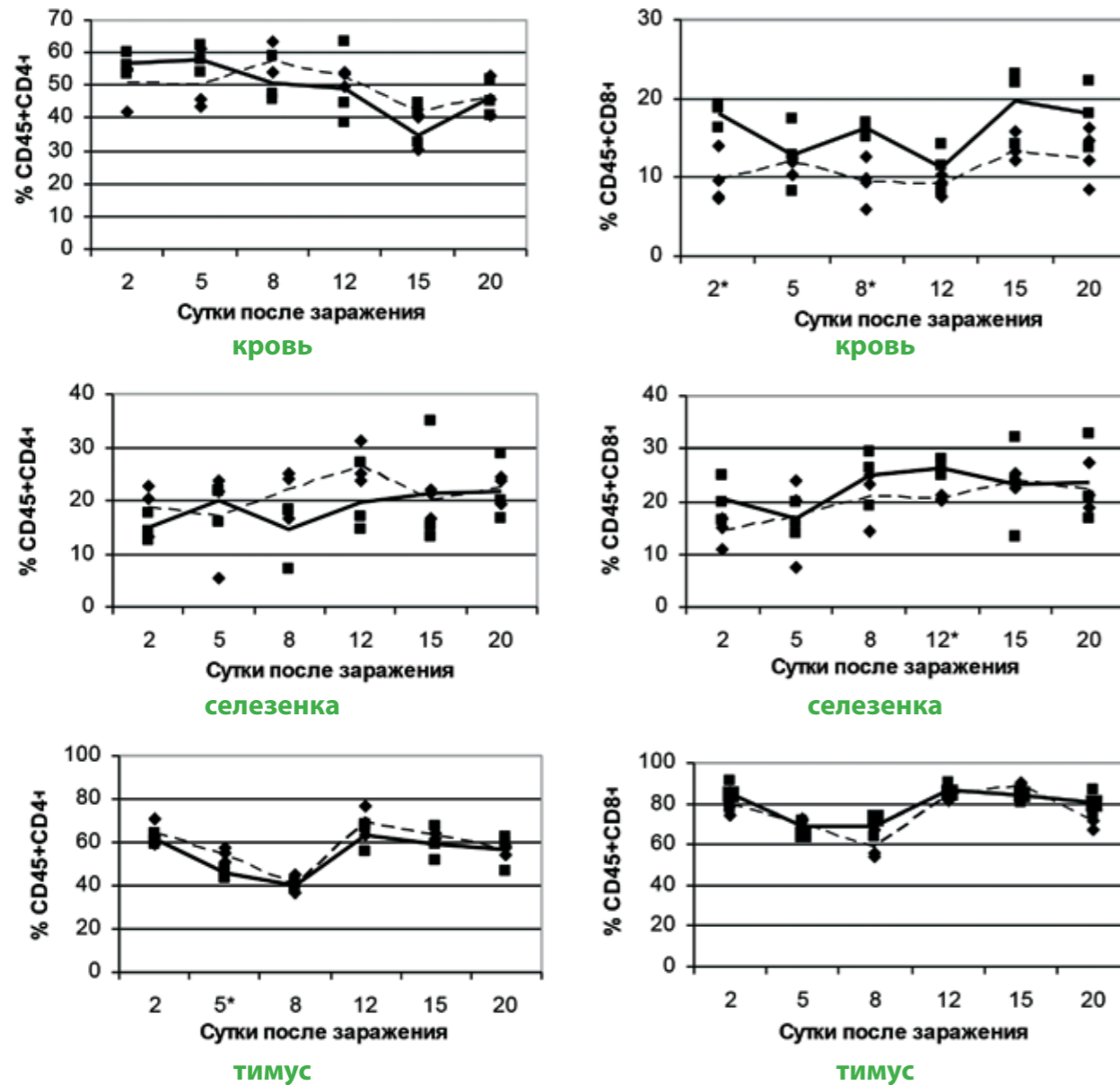


Рис. 5. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц

Отдельные символы представляют процентное количество клеток для индивидуальной птицы:

◆ — из контрольной группы, ■ — из инфицированной группы.

Линии представляют среднее арифметическое значение по группе:

сплошная линия — инфицированная группа, пунктирная линия — контрольная группа.

\* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы,  $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U-test.

10. Methyltransferase-defective avian metapneumovirus vaccines provide complete protection against challenge with the homologous Colorado strain and the heterologous Colorado strain and the heterologous Minnesota strain / J. Sun, Y. Wei, A. Rauf [et al.] // J. Virol. — 2014. — Vol. 88. — P. 12348–12363.

11. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United States and comparison with subgroup A and B viruses / H. Shin, K.T. Cameron, J.A. Jacobs [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40 (5). — P. 1687–1693.

12. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV)

reveal a novel APV subgroup / M.H. Băyon-Auboyer, C. Arnauld, D. Toquin, N. Etteradossi // J. Gen. Virol. — 2000. — Vol. 81. — P. 2723–2733.

13. Pathogenic and immunogenic responses in turkeys following *in ovo* exposure to avian metapneumovirus subtype C / R.M. Cha, M. Khatri, M. Mutnal, J.M. Sharma // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 30–36.

14. Rautenschlein S. Local and systemic immune responses following infection of broiler-type chickens with avian metapneumovirus subtypes A and B / S. Rautenschlein, Y.H. Aung, C. Haase // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 10–22.