



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕПРОДУКЦИОННЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ИЗОЛЯТА ОДИНЦОВО 02/14 В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Д.В. Шарыпова¹, И.Ю. Жуков², Н.Н. Власова³, О.С. Пузанкова⁴, В.Л. Гаврилова⁵, А.С. Иголкин⁶, Н.В. Коропова⁷, Т.В. Жбанова⁸

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

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

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

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

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

⁶ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

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

⁸ заведующий аспирантурой, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zhbanoa@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Изучены репродукционные свойства вируса африканской чумы свиней изолята Одинцово 02/14 в первичных культурах клеток в зависимости от добавления в питательную среду различных сывороток крови. В результате проведенных исследований установлено, что репродукция вируса наиболее успешно происходит в клетках костного мозга свиней и свиной почки при использовании фетальной сыворотки КРС и многоцелевого заменителя сыворотки FS FetalClone II.

Ключевые слова: африканская чума свиней, изолят, титр вируса, первичная культура клеток свиней, сыворотка крови, фетальная сыворотка.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) — особо опасное трансграничное контагиозное вирусное заболевание свиней всех видов и возрастов, характеризующееся лихорадкой, цианозом кожных покровов и обширными геморрагиями во внутренних органах инфицированных животных.

До настоящего времени не разработаны высокоэффективные средства специфической профилактики АЧС, в связи с чем определяющее значение в борьбе с данным заболеванием имеет своевременная диагностика и соблюдение высоких норм биобезопасности при ведении свиноводства. Чувствительность применяемых лабораторных методов диагностики в первую очередь зависит от концентрации вируса в испытуемых образцах (пробах) патологического материала.

В некоторых случаях, с целью накопления вируса АЧС в диагностических концентрациях, возникает необходимость проведения нескольких пассажей выделенного изолята вируса АЧС в различных перевиваемых и первичных культурах клеток свиней. Вирусосодержащий материал, полученный в различных культурах клеток, используется в диагностических ис-

следованиях, при изучении биологических, молекулярно-генетических свойств выделенных изолятов вируса АЧС [1, 3, 5, 8, 10, 11].

In vitro вирус АЧС репродуцируется в клетках гемопозитического происхождения — макрофагах/моноцитах из различных тканевых источников. К числу таких клеток относятся: альвеолярные макрофаги (АМС), клетки костного мозга (КМС), клетки почки (СП), спленоциты селезенки (СС), клетки тестикул (ТС) свиней. Многими авторами отмечено, что репродукция возбудителя АЧС активно происходит во фракции высокоадгезивных клеток общего пула макрофагов костного мозга свиней и менее активно — в лимфоцитах, нейтрофилах, эндотелиальных клетках [6, 10, 11].

Жизнеспособный вирус АЧС способен вызывать специфическую модуляцию мембран зараженных клеток, приводит к адсорбции эритроцитов на поверхности инфицированных клеток (гемадсорбции).

Гетерогенная популяция вируса АЧС обуславливает проявление гемадсорбции в первичных культурах клеток одновременно в двух или трех вариантах: рыхлая — инфицированные клетки адсорбируют до

20 эритроцитов; промежуточная — 20–40 эритроцитов; плотная — 40–80 эритроцитов на своей поверхности [5].

Показано, что при культивировании вируса *in vitro* вместо сыворотки крови свиней или КРС можно использовать многоцелевой заменитель сыворотки с дополнительными компонентами для клеток — FS FetalClon II, который содержит высокоочищенный термообработанный бычий сывороточный альбумин, бычий трансферрин, бычий инсулин и не содержит факторов роста — стероидных гормонов, глюкокортикоидов, факторов клеточной адгезии [8].

В отечественных и зарубежных литературных источниках недостаточно широко освещены сведения о размножении современных изолятов вируса АЧС в первичных культурах клеток свиней (КК КМС, ЛС, АМС, СП) с учетом добавления различных стимуляторов репродукционных свойств [1, 2, 5, 6, 8]. В связи с этим исследование по изучению этих свойств вируса АЧС, выделенного в последние годы на территории Российской Федерации, в различных первичных культурах клеток свиней является актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали поросят 2–4-месячного возраста живой массой 20–30 кг, полученных из благополучного по инфекционным болезням хозяйства Владимирской области.

Для исследований, после полного обескровливания, от поросят отбирали трубчатые кости, а также почки, селезенку и тестикулы [6, 9].

Культуры клеток. Клеточную суспензию инокулировали в лунки культуральных 96-луночных планшетов, пластиковые культуральные флаконы площадью 25 см² (матрасы), при этом в питательную среду добавляли 20%: 1) фетальной сыворотки КРС (ФС КРС; № 1 — PAN BIOTECH, США; № 2 — ФС КРС, РАА, Австрия); 2) нормальной сыворотки крови свиней (НСС); 3) клона II фетальной сыворотки КРС (FS FetalClon II, HyClone, США).

Инфицирование культур клеток проводили вирусом АЧС (изолят Одинцово 02/14), выделенным от дикого кабана на территории Московской области в 2014 г. Множественность заражения составляла 0,1–0,01 ГАДЕ/кл.

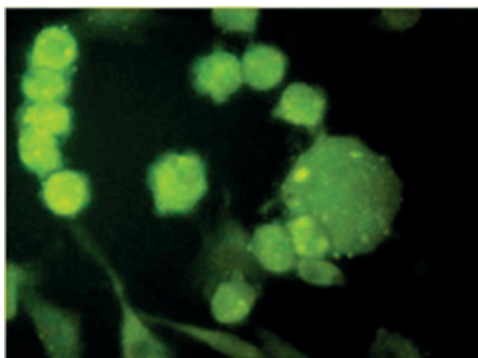


Рис. 1. Образование цитоплазматических включений в инфицированных вирусом АЧС клетках, формирование гигантской многоядерной клетки в РПИФ (окуляр $\times 10$; объектив $\times 60$)

Fig. 1. Formation of cytoplasmic inclusions in ASF virus-infected cells, formation of multinuclear giant cell, direct immunofluorescence test (ocular $\times 10$; objective $\times 60$)

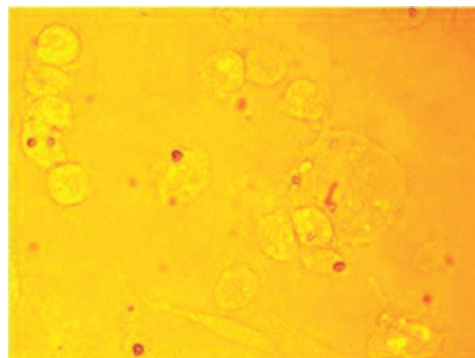


Рис. 2. Образование цитоплазматических включений в инфицированных вирусом АЧС клетках, формирование гигантской многоядерной клетки в светлом поле (окуляр $\times 10$; объектив $\times 60$)

Fig. 2. Formation of cytoplasmic inclusions in ASF virus-infected cells, formation of multinuclear giant cell observed against light background (ocular $\times 10$; objective $\times 60$)

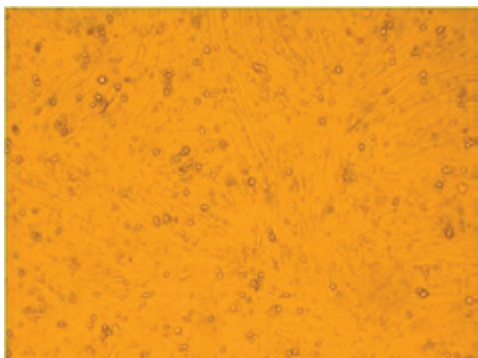


Рис. 3. Культура клеток тестикул свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр $\times 10$; объектив $\times 10$)

Fig. 3. Intact porcine testicle cell culture, negative control (ocular $\times 10$; objective $\times 10$)

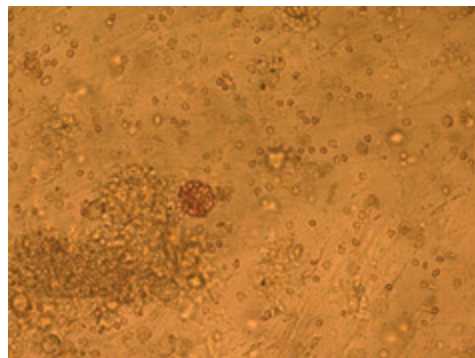


Рис. 4. Культура клеток тестикул свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр $\times 10$; объектив $\times 40$)

Fig. 4. Porcine testicle cell culture infected with ASF virus (ocular $\times 10$; objective $\times 40$)

Подсчет клеток проводили как с использованием стандартных прикладных методов (подсчет в камере Горяева), так и в автоматическом счетчике клеток Countess™ (Invitrogen™, Корея).

Инфицированные культуры клеток культивировали в CO₂-инкубаторе с содержанием 5% углекислого газа.

Репродукцию вируса АЧС в первичных культурах клеток контролировали при помощи реакций гемадсорбции и прямой иммунофлюоресценции.

Определение титра инфекционности вируса АЧС проводили путем его титрования в различных первичных культурах клеток при помощи реакции гемадсорбции (РГАд). Для титрования вируса АЧС использовали 2-суточный монослой культур клеток, выращенный в лунках 96-луночных микропланшетов. Постановку РГАд проводили по «классической схеме» с использованием рабочей суспензии эритроцитов поросенка [7]. Расчет инфекционного титра вируса проводили через 5–7 суток после заражения первичных культур клеток по методу Кербера (1931) в модификации И.П. Ашмарина (1959, 1962) и выражали в Ig ГАД₅₀/см³.

Наличие вируса АЧС во всех используемых в исследовании первичных культурах клеток подтверждали в реакции прямой иммунофлюоресценции (РПИФ). Для постановки РПИФ согласно инструкции использовали специфические ФИТЦ-иммуноглобулины для иммунофлюоресцентной диагностики АЧС (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров), а также моноклональные антитела 18 BG3-FITC, полученные на протеин vp72, меченные ФИТЦ (INGENASA, Испания). Наблюдение за проявлением цитопатического действия (ЦПД) проводили с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа ULWCD 0,30 Olympus модели СКХ41.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На одном из этапов проводимых работ для получения сравнимых образцов различных первичных культур клеток необходимо было подобрать их оптимальную посадочную концентрацию. В ходе исследований, при посеве с равной концентрацией клеток, количество клеток КМС, прикрепившихся ко дну пластикового матраса, было больше по сравнению с клетками СС. Для полу-

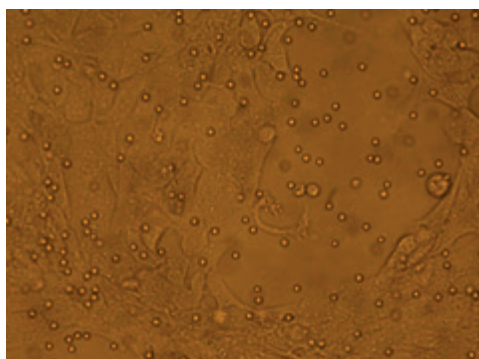


Рис. 5. Культура клеток почки свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 5. Intact porcine kidney cell culture, negative control (ocular ×10; objective ×40)

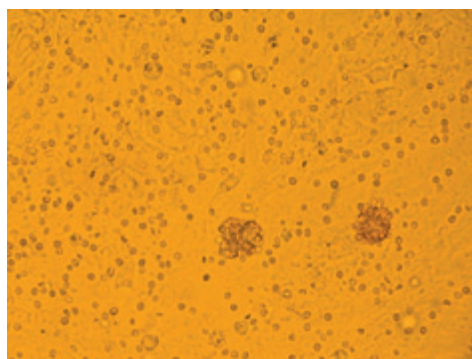


Рис. 6. Культура клеток почки свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 6. Porcine kidney cell culture infected with ASF virus (ocular ×10; objective ×40)

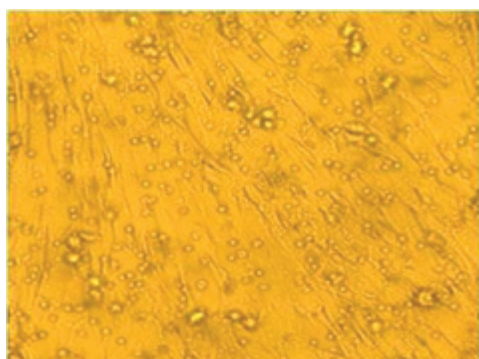


Рис. 7. Культура клеток костного мозга свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр ×10; объектив ×20)

Fig. 7. Intact porcine bone marrow cell culture, negative control (ocular ×10; object lens ×20)

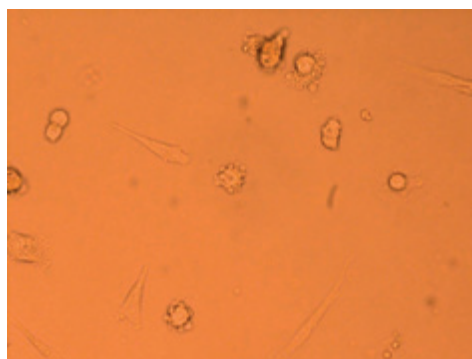


Рис. 8. Культура клеток костного мозга свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр ×10; объектив ×40)

Fig. 8. Porcine bone marrow cell culture infected with ASF virus (ocular ×10; object lens ×40)



Рис. 9. Культура клеток селезенки свиней, интактная, отрицательный контроль (окуляр $\times 10$; объектив $\times 20$)

Fig. 9. Intact porcine spleen cell culture, negative control (ocular $\times 10$; objective $\times 20$)

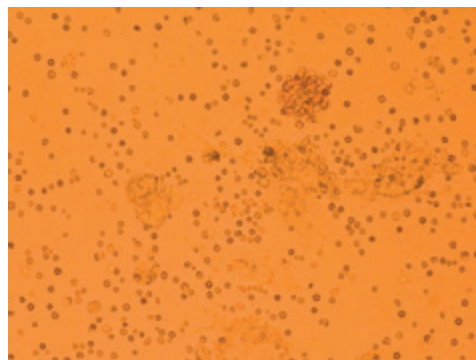


Рис. 10. Культура клеток селезенки свиней, инфицированная вирусом АЧС (окуляр $\times 10$; объектив $\times 40$)

Fig. 10. Porcine spleen cell culture infected with ASF virus (ocular $\times 10$; objective $\times 40$)

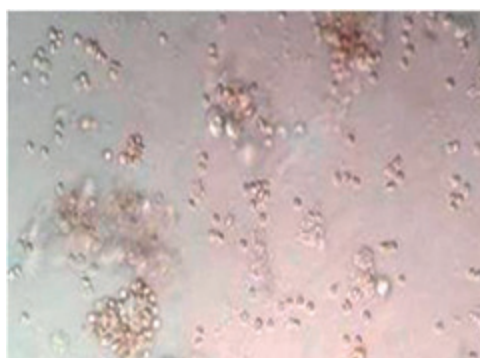


Рис. 11. Промежуточная и рыхлая гемадсорбция (окуляр $\times 10$; объектив $\times 20$)

Fig. 11. Intermediate and fluffy hemadsorption (ocular $\times 10$; objective $\times 20$)

чения плотного клеточного монослоя концентрация клеток СП при посеве варьировала от 500 тыс/см³ до 2 млн/см³, что в четыре раза больше, чем требуемая концентрация клеток ТС. Клеточный монослой ТС формировался через 24–48 ч, а для клеток СП выростал при этих концентрациях через 72–96 ч.

При посеве культур клеток КМС и СС использовали концентрацию клеток 5–6 млн/см³, монослой клеток формировался через 48–72 ч.

Выход клеточной суспензии в рабочей концентрации из органов, отобранных от одного поросенка, составлял: для КМС — 400–500 мл, для СС — 150–200 мл, для ТС — 200–300 мл, а максимальный объем составлял 600–800 мл — для клеток СП.

Таким образом, наиболее технологичной в получении являлась культура клеток СП, далее следовали КМС и ТС, и наименьший выход наблюдался для клеток СС.

Репродукция вируса АЧС в первичных культурах клеток КМС, СС, СП, ТС сопровождалась характерными морфологическими изменениями инфицированных клеток: деадгезирование отдельных клеток, вследствие чего клетки округлялись и затем наблюдался пикноз клеток.

В ходе исследований наблюдали, что через 18–36 ч в цитоплазме инфицированных клеток появлялись характерные включения, вирусспецифичность которых подтверждали в РПИФ с использованием ФИТЦ-

коньюгата моноклональных антител к $\nu p72$ вируса АЧС. Впоследствии клетки сливались друг с другом, образуя многоядерные гигантские клетки (рис. 1–2), спустя некоторое время отмечали их деструкцию, происходившую в результате вирусиндуцированного апоптоза.

На рис. 3, 5, 7, 9 представлены изображения интактных (отрицательный контроль), а на рис. 4, 6, 8, 10 — инфицированных вирусом АЧС первичных культур клеток ТС, СП, КМС и СС соответственно.

Результаты проведенных исследований показали, что при заражении культур клеток КМС, СП, СС, ТС вирусом АЧС (изолят Одинцово 02/14) наблюдали различные типы гемадсорбции (рис. 11): плотную (у 65–80% инфицированных клеток), промежуточную (у 10–15% инфицированных клеток) и рыхлую (у 5–10% инфицированных клеток).

Анализ скорости обнаружения вируса АЧС в РГАД показал, что минимальный срок появления гемадсорбции после инфицирования регистрировался для культуры клеток СС через 12–24 ч, в то время как для КМС и СП — через 48 ч, а ТС — через 48–72 ч.

Следовательно, для повышения скорости и эффективности диагностических исследований целесообразно использовать культуру клеток СС, в то время как остальные культуры клеток (КМС, СП и ТС) могут быть использованы для получения препаративных количеств вируса.

В ходе изучения репродукционных свойств вируса АЧС в первичных культурах клеток при добавлении различных сывороток (ФС КРС, НСС) и многоцелевого заменителя сыворотки FS FetalClon II отмечено, что наибольшие титры ($7,25 \pm 0,56$ Ig ГАД₅₀/см³) накопления вируса наблюдались в культуре клеток КМС с использованием FS FetalClon II через 120–168 ч после инокуляции вируса. Результаты расчета инфекционной активности вируса АЧС, полученного в различных культурах клеток с добавлением данных сывороток, представлены в таблице.

Определено, что при использовании FS FetalClon II титр вируса АЧС на культуре клеток КМС составлял $7,25 \pm 0,56$ Ig ГАД₅₀/см³, что в среднем на логарифм выше, чем при использовании ФС КРС № 2 ($6,25 \pm 0,43$ Ig ГАД₅₀/см³) и НСС ($6,00 \pm 0,46$ Ig ГАД₅₀/см³). На культуре клеток СС самые высокие титры были получены при использовании ФС КРС № 2 ($6,50 \pm 0,58$ Ig ГАД₅₀/см³), что на 3 логариф-

Таблица

Инфекционная активность вируса АЧС, полученного в первичных культурах клеток с использованием различных сывороток крови (n=5)

Наименование культуры клеток	Гемадсорбирующие титры вируса АЧС, полученные в первичных культурах клеток с использованием различных сывороток, Ig ГАД _{E₅₀} /см ³		
	ФС КРС №2	НСС	FS FetalClon II
КМС	6,25±0,43	6,00±0,46	7,25±0,56
СС	6,50±0,58	2,75±0,25	3,50±0,36
СП	6,25±0,25	5,75±0,25	6,00±0,25

ма выше, чем при использовании FS FetalClon II (3,50±0,36 Ig ГАД_{E₅₀}/см³) и на 4 логарифма выше, чем при использовании НСС (2,75±0,25 Ig ГАД_{E₅₀}/см³).

Вероятно, что ФС КРС наиболее эффективно поддерживает жизнедеятельность клеток СС, что и отражается в таких значительных отличиях в титрах. На культуре клеток СП лучшие результаты получены при использовании ФС КРС № 2 (6,25±0,25 Ig ГАД_{E₅₀}/см³), немного хуже — при использовании FS FetalClon II (6,00±0,25 Ig ГАД_{E₅₀}/см³) и НСС (5,75±0,25 Ig ГАД_{E₅₀}/см³).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа результатов проведенных исследований предложено для повышения скорости и эффективности диагностических исследований использовать культуру клеток СС, в то время как культуры клеток КМС, СП и ТС — для получения препаративных количеств вируса.

При изучении репродукции вируса АЧС изолята Одинцово 02/14 с использованием культуры клеток КМС выявлены наибольшие титры с применением фетальных сывороток FS FetalClone II (7,25±0,56 Ig ГАД_{E₅₀}/см³) и ФС КРС (6,25±0,43 Ig ГАД_{E₅₀}/см³).

Таким образом, в результате проведенных исследований подтверждено, что ФС КРС наиболее стабильно и эффективно поддерживает жизнедеятельность клеток СС, СП и КМС, а FS FetalClone II — только для культуры клеток КМС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И. Ветеринарная вирусология: учебное пособие. — Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. — 113 с.
2. Ветеринарный энциклопедический словарь / гл. ред. В.П. Шишков. — М.: «Советская энциклопедия», 1981. — С. 273–274, 412–413, 464–465.
3. Вирус африканской чумы свиней: культивирование, свойства, индикация. Эффективность различных методов выращивания вируса африканской чумы свиней в гемопоэтических клетках / Н.И. Закутский, Т.Г. Широкова, Н.С. Неверовская, С.Г. Юрков // Сельскохозяйственная биология. — 2014. — № 4. — С. 58–63.
4. Львов Д.К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. — М.: МИА, 2013. — С. 152–154.

5. Макаров В.В. Вирусология. — URL: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf_makarov/asf_makarov_virusologia.pdf (дата обращения: 11.04.16).

6. 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.

7. Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре костного мозга свиней / А.А. Варенцова, И.Ю. Жуков, В.Л. Гаврилова [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2014. — 21 с.

8. Патология клеток лимфоидной ткани, in vitro инфицированных вирусом африканской чумы свиней / Е.М. Каралова, Г.Е. Восканян, Х.В. Саркисян [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2011. — № 1. — С. 33–37.

9. Оптимизация условий получения культуры клеток костного мозга свиней / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.А. Варенцова [и др.] // Молодежь и наука XXI: сб. научных трудов IV Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. — Т. 1. — С. 46–52.

10. De Leon P., Bustos M.J., Carrascosa A.L. Laboratory methods to study African swine fever virus // Virus Res. — 2013. — Vol. 173, № 1. — P. 168–179.

11. IL-23/IL-17/G-CSF pathway is associated with granulocyte recruitment to the lung during African swine fever / Z. Karalyan [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2016. — Vol. 179. — P. 58–62.