

an outbreak of HPAI in poultry was reported in the Primorsky Krai, when H5N1 virus was isolated. The strain differed from the one isolated in 2005 and was first assigned to Clade 2.3.2 and then due to updated classification to Clade 2.3.2.1. In September 2014 the virus from this genetic clade was isolated from poultry in the Altai Krai. Tests for protective activity of the «conventional», Novosibirsk strain-based vaccine that had been used since 2006 demonstrated, following the challenge of the vaccinated poultry with new epizootic strain «Primorsky», that the protection of poultry from clinical signs and death was maximum 70%. The serological tests also confirmed variability of the virus of the two genetic lineages within one strain. It is necessary to note that the monitoring tests carried out in some RF subjects demonstrated low immunity level to H5 AI virus in backyard poultry, thus, suggesting insufficient scope of vaccination leading to non-effective AI preventive measures. In addition to it, there may be certain difficulties when drafting vaccination strategy for future, since it is impossible to predict which AIV might be introduced to the RF territory. The risk of AIV introduction from adjacent countries is still there, primarily from South East Asia and the Far East, where HPAI viruses H5N1, H5N2, H5N8 and LPAI virus H7N9, H10N8, H9N2 circulate. Asymptomatic AI in wild migratory birds simply conceals the virus carrier state and hampers early detection of potential threats.

Y. Sakoda (Hokkaido University, Sapporo, Japan) thinks that vaccination against AI cannot be a useful alternative to drastic measures, in addition to it, it poses great risk associated with the virus reassortment and can be a reason for the following unpredictable epizooties caused by new mutated strains. The author points to the fact that vaccination against HPAI can be a precondition for selection of new antigenic variants of the virus [8].

Taking into account current epizootic situation in the world, it is reasonable to put amendments into the control strategy. It will be acceptable to cancel preventive vaccination against H5 AIV in the Russian Federation, if reserves of efficient vaccine are maintained in order to ensure ring vaccination around the affected areas in case of an outbreak.

High-level biosafety is definitely the most effective way to prevent AI virus from penetrating into closed-type poultry farms. Monitoring measures taken in the RF facilitate timely detection of AI introduction and outbreaks [2]. Backyards and small commercial farms with free-range poultry are still most vulnerable. In order to early detect the threats and timely respond to them, it is appropriate to ensure monitoring in populations of wild and synanthropic birds for specific antibodies and for infectious agents and to isolate new AIV variants. Research into the new virus variants will help to rapidly develop a set of preventive measures to control the new risks. Taking into account that the two latest outbreaks of HPAI H5N1 (2008, 2014) reported in poultry in Russia were caused by the virus introduced to the backyards with hunting trophies, it is required to pay special attention to public awareness campaign for AI prophylaxis.

The following major priority directions can be, thus, determined to control AI:

1. Epizootic monitoring with the risk assessment for potential AI virus introduction to the RF territory.
2. Reserves of efficient vaccines against AI shall be maintained in order to rapidly block major routes of infection transmission.
3. Development of inactivated vaccines against currently circulating epizootic AIV strains and monitoring their efficiency.

4. Study AI virus circulation in natural biotopes of wild waterfowls and birds of anthropogenic areas using active monitoring tools.

5. Control of possible import/export risks in compliance with the recommendations of the World Organization for Animal Health (OIE) and common veterinary and sanitary requirements of the Customs Union.

6. Serological and virological monitoring of backyard poultry and poultry on the open-type commercial farms in order to establish if they may have any contact with the field AI virus.

7. Control of ensuring high level of biosafety at commercial closed-type poultry farms.

8. Public awareness campaigns for AI prevention.

9. Development of economic loss compensation programs for poultry owners implemented during outbreak eradication (social and economic aspect of AI control).

CONCLUSION

Epizootological monitoring is a key element in the overall AI control strategy. Future monitoring tests shall be planned in accordance with the epizootic situation in Russia and in the world (historical and geographical planning), density of the agricultural poultry population in the country and migration routes.

The strong need to strengthen epidemic and epizootic surveillance and to improve control tools and methods is explained by the rapid evolution of type A AI virus, rapid changes of its pathogenic properties, wide spread in the wild and its ability to overcome interspecies barriers, wide range of susceptible animals; the virus pandemic potential and unpredictable consequences of its penetration into the commercial farms.

REFERENCES

1. Prognosis for HPAI H5N1 in the Russian Federation in 2014 / V.N. Irza, M.S. Volkov, A.V. Varkentin [et al.]; FGBI «ARRIAH» // Prognoses for some animal diseases in the Russian Federation in 2014. — Vladimir, 2014. — 24 p.
2. Expedition to the Republic of Tyva within monitoring of AI and Newcastle disease / I.A. Chvala, A.V. Andriyasov, M.A. Tsyvanyuk [et al.] // Veterinary Today. — 2014. — № 4 (11) — P. 54–57.
3. Virology Manual. Human and animal viruses and viral infections / FGBI «Ivanovsky Institute of Virology» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ed. D.K. Lyvov. — M.: Med. Inform. Agency, 2013 — 1197 p.
4. Smorodintsev A.A., Alexandrova G.I. Results and prospects of AI vaccine prophylaxis // Voprosy Virusologii. — 1977. — № 3. — P. 259–271.
5. Schelkonov M.Yu., Lyvov D.K. New subtype of AI A type isolated from bats and new objectives of eco-virological monitoring // Voprosy Virusologii. — 2012. — № 1 — P. 159–168.
6. Avian H5N1 influenza in cats / T. Kuiken, G. Rimmelzwaan, D. Van Riel [et al.] // Science. — 2004. — Vol. 306, № 5694. — P. 241.
7. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO / WHO. — URL: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en (data of application: 22.03.15).
8. Sakoda Y. Characterization of avian influenza viruses recently isolated in Japan // International Conference on Avian Influenza: Prevention and Control, November 18–19 2014, New Taipei City/Taiwan. — Taipei, 2014. — 249 p.

УДК 619:578.825.1:57.082.26

ПРИМЕНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДУЛЬБЕККО DMEM/F12 НАМ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНОВ КУР

Е.Ю. Ханюкова¹, М.А. Шустова², Н.Е. Камалова³

¹ ведущий биолог, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: Elena.Urjevna@gmail.com

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

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

РЕЗЮМЕ

Изучена возможность применения питательной среды Дульбекко DMEM/F12 Нам для культивирования вируса болезни Марека в культуре клеток фибробластов эмбрионов кур. Определили, что при оптимально подобранных параметрах культивирования вируса в монослое клеток использование данной среды позволяет получить вирусный материал с высокой инфекционной активностью агента.

Ключевые слова: вирус болезни Марека, культура клеток фибробластов эмбрионов кур, питательная среда Дульбекко DMEM/F12 Нам, инфекционная активность.

UDC 619:578.825.1:57.082.26

USE OF DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM DMEM/F12 HAM FOR MAREK'S DISEASE VIRUS CULTIVATION IN CHICKEN EMBRYO FIBROBLASTS

Ye.Yu. Khanyukova¹, M.A. Shustova², H.Ye. Kamalova³

¹ Leading Biologist, Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: Elena.Urjevna@gmail.com

² Leading Biologist, Postgraduate Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shustova@arriah.ru

³ Chief Researcher, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kamalova@arriah.ru

SUMMARY

The opportunity of using Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 Ham for Marek's disease virus cultivation in chicken embryo fibroblasts was studied. It was determined that if appropriate virus cultivation parameters are chosen the abovementioned medium enables to prepare virus material with high agent infectivity.

Key words: Marek's disease virus, chicken embryo fibroblasts, Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM/F12 Ham, infectivity.

ВВЕДЕНИЕ

В качестве биологической системы для культивирования вируса болезни Марека (ВБМ) в производстве используют первично трипсинизированную культуру клеток фибробластов эмбрионов SPF-кур (ФЭК) [4, 5]. ВБМ обладает высокой степенью ассоциации с клеткой. Поэтому основная задача заключается в получении наибольшего количества жизнеспособных вирусосодержащих клеток. Для жизнеспособности клеток *in vitro* необходимо учитывать ряд физико-химических и метаболических факторов. Известно, что на процессы формирования монослоя культуры клеток существенное влияние оказывают состав и качество используемой питательной среды, в которой содержатся все необходимые для этого компоненты (макро-, микроэлементы, аминокислоты, витамины, глюкоза). Кроме того, применение различных поддерживающих питательных сред после инфицирования монослоя оказывает влияние на результаты накопления вируса в клетках, что обуславливает варьирование показателей инфекционной активности получаемых вирусосодержащих препаратов [1, 3].

Технология промышленного культивирования культуры клеток ФЭК в ФГБУ «ВНИИЗЖ» и производство вирусосодержащей суспензии ВБМ осуществляется с использованием питательной среды, состоящей из равных частей среды 199, Игла и гидролизата лактальбумина на солевом растворе Хенкса (ГЛАХ) с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота. Известно, что при культивировании клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридов, широко применяют среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с содержанием F12 Ham и двойным содержанием аминокислот.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании возможности применения питательной среды Дульбекко DMEM/F12 Ham для культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Вакцинный производственный штамм «3004 №109-ДЕП» ВБМ.

Культура клеток. Для культивирования вируса и определения его инфекционной активности использовали первично трипсинизированную культуру клеток ФЭК, которую получали из 11-суточных эмбрионов SPF-кур фирмы Valo Biomedica (Германия). Культивирование культуры клеток ФЭК осуществляли на внутренней поверхности стеклянных роллерных сосудов емкостью 3 дм³ при температуре 38,5±1,0 °С в течение 24–48 ч. Посевная концентрация составляла 1,3±0,08 млн кл./см³, объем засеваемой суспензии — 300 см³.

Для определения инфекционной активности вируса культуру клеток выращивали в культуральных пластиковых флаконах фирмы Corning (25 см²) при температуре 38,5±1,0 °С. Средняя посевная концентрация клеток была 0,8±0,03 млн кл./см³.

Растворы и реактивы. В работе использовали: питательную среду, состоящую из равных частей среды 199, Игла и ГЛАХ (контроль), и коммерческую питательную среду фирмы Sigma Дульбекко DMEM/F12 Ham. Для роста клеток применяли питательную среду с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, а для поддержания культуры клеток процент сыворотки снижали до 2–5%. Величина pH ростовых и поддер-

живающих сред составляла 6,9–7,2. Для дезагрегации инфицированного монослоя ФЭК применяли 0,25% раствора трипсина.

Культивирование вируса. В выращенную в роллерных сосудах культуру клеток ФЭК одновременно с заменой ростовой среды на поддерживающую вносили ВБМ в дозе 10⁴ ФОЕ/см³ на сосуд. ВБМ культивировали при температуре 38,5±1,0 °С в течение 72–96 ч. Контроль за состоянием инфицированного монослоя клеток проводили с помощью ежедневной микроскопии. При распространении ЦПД вируса на 75% площади монослоя культуру клеток подвергали дезагрегации раствором трипсина и центрифугировали. Вирусосодержащие клетки ресуспендировали в питательной среде с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота в расчете 10 см³ на сосуд. В полученных образцах определяли концентрацию клеток и инфекционную активность вируса.

Определение концентрации клеток. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Число клеток в 1 см³ суспензии определяли по формуле:

$$C = A/n \times 2,5 \times 10^6 \times B,$$

где C — число клеток в 1 см³ суспензии;

A — количество учтенных клеток;

n — число больших квадратов, участвующих в подсчете;

B — кратность разведения суспензии.

Определение инфекционной активности вируса. Инфекционный титр вируса определяли по числу фокусобразующих единиц (ФОЕ) в монослое клеток ФЭК, выращенных во флаконах. Использовали метод последовательных разведений вирусосодержащей суспензии. Для оценки титра вируса устанавливали наименьшее разведение, при котором число ФОЕ было максимальным, без слияния фокусов. Величину титра определяли по следующей формуле:

$$T = \{[(b_1 + b_2 + \dots + b_n)/n] \times 10^6\} / V,$$

где T — титр вируса, ФОЕ/см³;

b₁, b₂, ... b_n — количество фокусов во флаконе;

n — количество используемых флаконов;

V — объем суспензии вируса, внесенный во флакон, см³;

a — показатель степени разведения вирусосодержащего материала.

Обработка результатов экспериментов. Использовали общепринятые методы вычисления средних значений и стандартных ошибок (±m) [2]. Для вычислительных операций использовали программу Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытания каждой из питательной сред проводили не менее чем на 9 роллерах с культурой клеток ФЭК. Величина исходной посевной концентрации клеток была постоянной и составляла 1,3±0,08 млн кл./см³. В варианте № 1 (контроль) использовали питательную среду, состоящую из равных частей среды 199, Игла и ГЛАХ, а в варианте № 2 — среду Дульбекко DMEM/F12 Ham. Исследования по сравнению двух вариантов культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК оценивали по выходу вирусосодержащих клеток (C, млн кл./см³), а также по показателю инфекционной активности (T, Ig ФОЕ/см³). Полученные результаты представили в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о существенной разнице концентрации вирусинфицированных клеток

в суспензии (p≤0,05), полученной при использовании среды Дульбекко DMEM/F12 Ham, в сравнении со средой, состоящей из равных частей среды 199, Игла и ГЛАХ, в 1,2 раза. Это может быть обусловлено наличием большего набора ростовых факторов в питательной среде Дульбекко DMEM/F12 Ham, вследствие чего пролиферация клеток происходила интенсивнее и, вероятно, плотность монослоя на 1 см² была выше, чем в варианте № 1. Однако и лимитирующие условия в варианте № 2 со средой Дульбекко DMEM/F12 Ham наступали быстрее, чем в контроле, вследствие чего наблюдали дегенерацию инфицированного монослоя к моменту окончания культивирования. При сравнении инфекционной активности вируса значимых различий между двумя вариантами культивирования не обнаружено. В варианте № 1 (контроль) на 1 млн кл./см³ приходилось в среднем ~0,37 Ig ФОЕ/см³, а во втором — ~0,32 Ig ФОЕ/см³. Это означает, что распространение вируса с применением среды Дульбекко DMEM/F12 Ham происходило медленнее относительно контроля. Вышеперечисленные обстоятельства могли сказаться на показателях полученного вирусосодержащего материала.

Поскольку инфекционный титр культивированного вируса является наиболее важным показателем для процесса производства вакцин против болезни Марека, исследования были продолжены. На следующем этапе работы исходная посевная концентрация для среды Дульбекко DMEM/F12 Ham была снижена до 1,01 млн кл./см³ (т.е. в 1,2 раза). Посевную концентрацию клеток ФЭК для контроля не меняли. Производили оценку по тем же показателям, что и ранее (табл. 2).

По данным табл. 2 видно, что такие показатели, как урожай клеток и инфекционный титр вируса с применением среды Дульбекко DMEM/F12 Ham, были выше аналогичных показателей контроля, однако статистических отличий выявлено не было. Дегенеративных изменений монослоя при культивировании ВБМ в культуре клеток ФЭК с применением среды Дульбекко DMEM/F12 Ham в заданных условиях постановки эксперимента не наблюдали.

Вышесказанное позволяет считать, что для культивирования монослоя культур клеток ФЭК с последующим инфицированием и накоплением ВБМ можно успешно применять среду Дульбекко DMEM/F12 Ham. При оптимизации условий культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК с использованием данной среды возможно получить вирусосодержащий материал с высокой инфекционной активностью агента, что немало важно при производстве эффективных вирусвакцин против болезни Марека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что питательная среда Дульбекко DMEM/F12 Ham может быть успешно применена для

Таблица 1
Результаты оценки культивирования вируса болезни Марека в культуре клеток ФЭК (n=4)

№ варианта	Концентрация клеток, млн кл./см ³	Инфекционная активность вируса, Ig ФОЕ/см ³
1	16,87±0,44	6,18±0,21
2	19,60±0,49*	6,33±0,20

* существенность среднего контраста определяли проверкой выполнимости неравенства, имеющего вид $t \geq t_p$, где t_p — табличное значение Стьюдента для избранного уровня значимости (p) и данного числа степеней свободы ($v=n_1+n_2-2$).

Таблица 2
Накопление вируса болезни Марека в культуре клеток ФЭК (n=4)

№ варианта	Концентрация клеток, млн кл./см ³	Инфекционная активность вируса, Ig ФОЕ/см ³
1	17,78±0,37	6,64±0,18
2	18,87±0,39	6,90±0,15

— существенность среднего контраста определяли проверкой выполнимости неравенства, имеющего вид $t \geq t_p$, где t_p — табличное значение Стьюдента для избранного уровня значимости (p) и данного числа степеней свободы ($v=n_1+n_2-2$).

культивирования ВБМ в культуре клеток ФЭК в качестве альтернативного варианта среды, используемой в ФГБУ «ВНИИЗЖ». При оптимально подобранных параметрах культивирования вируса в монослое клеток ФЭК использование данной среды позволяет получить вирусосодержащий материал с высокой инфекционной активностью агента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология клеток животных / Р.Е. Спирер, Г.Д. Адамс, Дж.Б. Гриффитс [и др.]. — М.: Агропромиздат, 1989. — Т. 2. — С. 5–8.
2. Закс Л. Статистическое оценивание. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
3. Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих // Методы культивирования клеток: сб. научных трудов. — Л.: Наука, 1988. — С. 44–63.
4. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. — М.: Мир, 1989. — 333 с.
5. Calnek B.W., Witter R.L. Marek's disease // Diseases of Poultry / ed. B.W. Calnek [et al.]. — Ames, Iowa. — 1997. — P. 369–413.