



УДК 619:616.72-002-022.6:636.52/58:57.082.26

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РЕОВИРУСА ПТИЦ ШТАММА «ARV04/02» В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

**М.Н. Митрофанова<sup>1</sup>, Л.В. Малахова<sup>2</sup>, Б.Л. Манин<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mitrofanova@arriah.ru

<sup>2</sup> старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: burdeynaya@arriah.ru

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

## РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по изучению культивирования вируса реовирусного теносиновита кур в различных клеточных системах. Установлено, что штамм «ARV04/02» способен к репродукции во всех исследуемых линиях клеток: ФЭК, Vero-V, ПСКГ-30, Taurus-4, MARC-145 уже на первом пассаже. Наиболее высокий уровень накопления вируса наблюдали в клеточной культуре ФЭК при дозе заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. и времени культивирования 72–96 часов.

Ключевые слова: реовирусный теносиновит, штамм «ARV04/02», клеточные культуры, культивирование реовируса.

UDC 619:616.72-002-022.6:636.52/58:57.082.26

# CULTIVATION OF AVIAN REOVIRUS ARV04/02 STRAIN IN DIFFERENT CELL CULTURES

**M.N. Mitrofanova<sup>1</sup>, L.V. Malakhova<sup>2</sup>, B.L. Manin<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mitrofanova@arriah.ru

<sup>2</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: burdeynaya@arriah.ru

<sup>3</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

## SUMMARY

The paper demonstrates data on experimental cultivation of avian reovirus tenosynovitis agent in different cell cultures. It was indicated that strain ARV04/02 was capable of reproduction in all tested cell cultures (CEF, Vero-V, PSKG-30, Taurus-4, MARC-145) at the first passage already. The highest level of the virus accumulation was observed in CEF culture at the infection dose of 0.1 TCID<sub>50</sub>/cell and during 72-96 hours of cultivation.

Key words: reovirus tenosynovitis, ARV04/02, cell cultures, reovirus cultivation.

## ВВЕДЕНИЕ

Реовирусный теносиновит птиц является одним из основных опасных заболеваний, наносящих значительный экономический ущерб мировому промышленному птицеводству [2, 3]. Эпизоотическая ситуация в России сложилась так, что реовирусный теносиновит птиц с середины 90-х годов XX века регистрируется повсеместно [1]. Экономические потери при данном заболевании связаны с низкой продуктивностью особей, снижением категорийности тушек, повышенной выбраковкой, уменьшением яйценоскости на 6–20% и гибелью птиц. При этом повышаются расходы на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий в хозяйствах, неэффективно используется корм [2]. Основным способом профилактики заболевания реовирусным теносиновитом является вакцинация цыплят, молодняка и родительского стада живыми и инактивированными препаратами [3].

Одним из ключевых этапов разработки технологии изготовления качественных и эффективных вакцин против реовирусного теносиновита кур является выбор системы культивирования для репродукции вируса, обеспечивающей получение препарата с высокой протективной и антигенной активностью [4]. Обычно для получения реовируса естественная система культивирования — первично трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) [6]. Как правило, реовирус обнаруживается в культуре клеток ФЭК с наличием четко выраженного цитопатического действия (ЦПД) уже на третьи сутки. Данная культура считается наиболее оптимальной для репродукции реовируса [5, 9]. Также существует возможность адаптации реовируса к перевиваемым клеточным линиям для получения антигена. Так как доступных для промышленного выращивания перевиваемых клеточных линий птичьего происхождения очень мало, используются постоянные культуры разных млекопитающих (обезьян, свиней и КРС) [7, 8].

Целью данной работы явился подбор наиболее чувствительной культуры клеток для репродукции штамма «ARV04/02» реовируса птиц и отработка оптимальных условий его культивирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирус.** Реовирус птиц, штамм «ARV04/02» (штамм ФГБУ «ВНИИЗЖ»), адаптированный к первичной культуре клеток ФЭК (5 пассаж), с инфекционной активностью  $5,5 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ ; реовирус птиц, вакцинный штамм «1133», 4 пассаж ФЭК с инфекционной активностью  $6,5 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ .

**Культуры клеток.** Для культивирования реовируса птиц и определения его инфекционной активности использовали первично трипсинизированную культуру клеток ФЭК. Первичную культуру клеток ФЭК готовили из 10–12-суточных эмбрионов СПФ-кур фирмы Lohmann (Германия).

Посевная концентрация клеток ФЭК составляла: для пенициллиновых флаконов —  $400\text{--}500 \text{ тыс}/\text{см}^3$ , для клинских матрасов —  $200\text{--}300 \text{ тыс}/\text{см}^3$ , для роллерных сосудов —  $1,2\text{--}1,5 \text{ млн кл}/\text{см}^3$ .

Также в работе использовали перевиваемые культуры клеток: Vero-V (почка африканской зелёной мартышки), ПСГК-30 (почка сибирского горного козерога), Taurus-4 (почка телёнка), MARC-145 (почка макаки-резус).

После инокуляции культуры клеток выращивали до стадии хорошо сформированного монослоя без признаков дегенерации. Перевиваемые культуры высеивали во все перечисленные сосуды в концентрации  $120\text{--}150 \text{ тыс. клеток в см}^3$ . Вирус вносили после формирования конфлюэнтного монослоя.

**Питательные среды и растворы.** В качестве ростовой питательной среды использовали синтетическую питательную среду ПСП с 10% сывороткой крови КРС (рН 7,0–7,1).

В качестве поддерживающей среды использовали также питательную среду ПСП с 2% инактивированной сывороткой КРС (рН 7,3–7,5).

Монослой культуры клеток отмывали солевым раствором Хенкса (рН 7,1–7,2).

Трипсинизацию куриных эмбрионов проводили 0,25% раствором трипсина (рН 7,5).

Полученный реовирус птиц титровали в пенициллиновых флаконах на гомологичных культурах клеток методом последовательных 10-кратных разведений. Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в  $\text{lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

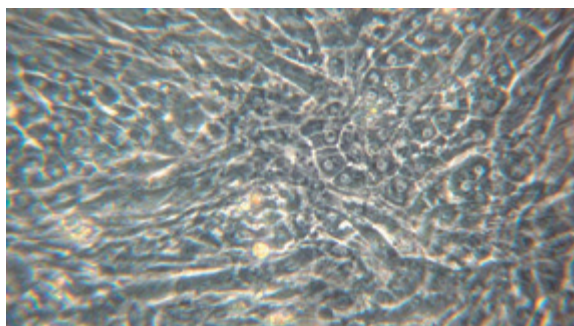
На первом этапе работы проводили адаптацию реовируса птиц штамма «ARV04/02» к различным культурам клеток и определяли наиболее чувствительную и эффективную клеточную систему для его репродукции. В процессе скрининга были использованы следующие клеточные линии: ФЭК, Vero-V, ПСГК-30, Taurus-4, MARC-145. Культуры клеток выращивали в 50-граммовых пластиковых матрасах в течение 2 суток. Множественность заражения составила  $0,1 \text{ TCD}_{50}/\text{кл}$ . На каждой клеточной культуре было проведено пять пассажей. На всех пассажных уровнях каждые 24 часа наблюдали проявление ЦПД в клеточном монослое. Съём вируса проводили при 80–90% поражении монослоя клеток. Вирусосодержащий материал каждого пассажа титровали на культуре клеток ФЭК.

Уже на 1 пассаже во всех культурах клеток наблюдалось ЦПД вируса, наиболее четко выраженное в клеточных линиях ФЭК и Vero-V. Картина ЦПД была различной. В культуре клеток ФЭК, монослой которой представлен в основном веретенообразными клетками, наблюдалось округление клеток и отслоение их от стекла, в культуре Vero-V — образование большого количества конгломератов, в культуре Taurus-4 — появление «окон» в монослое и разрушение клеток, в культуре MARC-145 — образование округлых клеток и слияние их границ с образованием симпластов. Во всех клеточных линиях, кроме ПСГК-30, в процессе пассирования отмечали постепенное накопление вируса. Наиболее стабильное и последовательное увеличение титра к 5 пассажу наблюдали при репродукции реовируса в культурах клеток ФЭК и Vero-V:  $5,67 \pm 0,14$  и  $5,08 \pm 0,14 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$  соответственно, титр вируса в культурах клеток MARC-145 и Taurus-4 был значительно ниже и составлял  $3,75 \pm 0,00$  и  $4,33 \pm 0,18 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$  соответственно.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что динамика и уровень накопления вируса в клеточных культурах были неодинаковы. Так, в клеточной культуре ФЭК с 1 пассажа титр был значительно выше, чем в клетках ПСГК, MARC-145 и Taurus-4.

**Таблица 1**  
**Уровень накопления реовируса птиц штамма «ARV04/02» в стационарных клеточных культурах**

Вид культуры клеток	Уровень накопления вируса, $Ig\ TCD_{50}/cm^3$				
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
ФЭК	5,33±0,18	5,25±0,00	5,33±0,18	5,58±0,14	5,67±0,14
Vero-V	4,58±0,14	4,33±0,18	4,67±0,14	4,67±0,14	5,08±0,14
ПСГК-30	3,33±0,18	3,58±0,14	3,25±0,25	3,08±0,14	3,33±0,18
Taurus-4	4,25±0,00	3,75±0,25	3,33±0,18	4,00±0,00	4,33±0,18
MARC-145	3,08±0,14	3,33±0,18	3,75±0,25	4,25±0,25	3,75±0,00

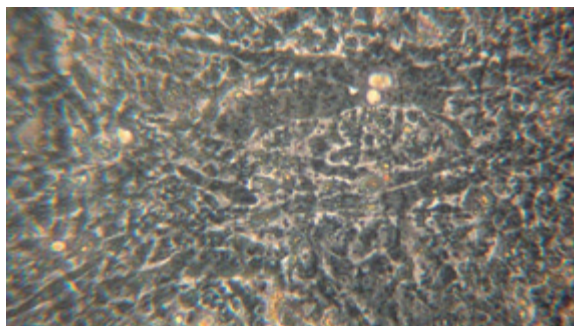


*Рис. 1. Нормальная морфология клеточной культуры ФЭК (контроль, объектив ×40)*

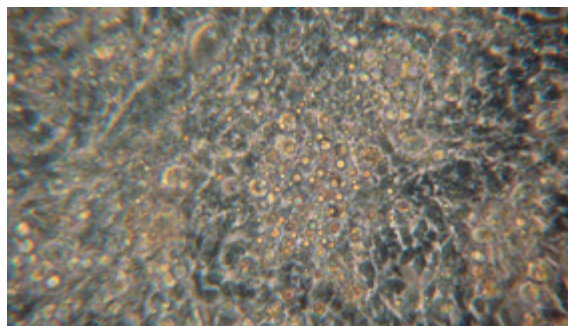
Титр вируса в культуре клеток Vero-V также находился на достаточно высоком уровне и увеличился к 5 пассажу на 0,5 логарифма.

Динамика цитопатических изменений в культуре клеток ФЭК, инфицированных реовирусом птиц штамм «ARV04/02», представлена на рис. 1–5.

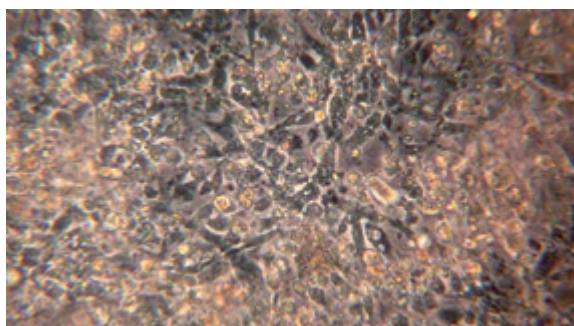
Следующим этапом исследований являлось определение множественности заражения и времени культивирования реовируса птиц штамм «ARV04/02». Использовали дозу заражения 1,0; 0,1 и 0,01  $TCD_{50}/кл.$  Патологические изменения в клетках ФЭК учитывали через каждые 24 часа. Сбор вируса производился при



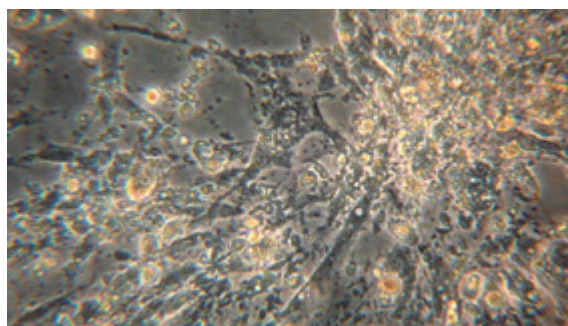
*Рис. 2. ЦПД вируса в клетках через 24 часа культивирования (объектив ×40)*



*Рис. 3. ЦПД вируса в клетках через 48 часов культивирования (объектив ×40)*



*Рис. 4. ЦПД вируса в клетках через 72 часа культивирования (объектив ×40)*



*Рис. 5. ЦПД вируса в клетках через 96 часов культивирования (объектив ×40)*

**Таблица 2**  
Влияние множественности заражения и времени культивирования реовируса птиц в культуре клеток ФЭК

Время культивирования, ч	Уровень накопления вируса, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>		
	0,01 ТЦД <sub>50</sub> /кл	0,1 ТЦД <sub>50</sub> /кл	1,0 ТЦД <sub>50</sub> /кл
24	3,67±0,14	4,08±0,14	4,75±0,00
48	4,08±0,14	5,08±0,14	5,33±0,18
72	4,33±0,18	5,33±0,18	5,08±0,14
96	4,67±0,14	5,67±0,14	5,08±0,14

полном разрушении клеток. Активность вируса определяли методом титрования на культуре клеток ФЭК. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Из таблицы видно, что при использовании дозы заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл отмечали наиболее высокое накопление вируса. С увеличением срока культивирования реовируса его инфекционная активность повышалась и достигала максимума к 96 часам, титр вируса составил 5,67±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, в то время как при множественности заражения 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл титр вируса к 96 часам составил 4,67±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, а при 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл — 5,08±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы и анализа полученных данных установлено, что штамм реовируса птиц «ARV04/02» способен к репродукции во всех исследуемых линиях клеток: ФЭК, Vero-V, ПСКГ-30, Taurus-4, MARC-145 уже на первом пассаже. Однако в клеточной культуре ФЭК уровень накопления вируса был значительно выше, чем в остальных перевиваемых линиях, и находился на уровне 5,67±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Наиболее оптимальным для данного штамма является время культивирования 72–96 часов при дозе заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Титр вируса в культуре клеток Vero-V также находился на достаточно высоком уровне и составил к пятому пассажиру 5,08±0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Таким образом, культуры клеток ФЭК и Vero-V могут быть рекомендованы для культивирования и титрования реовируса птиц штамма «ARV04/02».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: материалы 54-й межвузовской науч.-практ. конф., Кострома, 6–7 февраля 2003 г. — Кострома, 2003. — 63 с.
2. Алиев А.С. Реовирусная инфекция птиц // Ветеринария с/х животных. — 2005. — № 12. — С. 28–33.
3. Пругло В.В., Трефилов Б.Б. Реовирусные инфекции птиц // Ветеринария в птицеводстве. — 2006. — № 5. — С. 31–35.
4. Сергеев В.А. Вирусные вакцины: монограф. — Киев: Урожай, 1993. — 368 с.
5. Состояние и перспективы развития научных исследований по профилактике и лечению болезней с/х животных и птиц: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодарской НИВС. — Ч. 1. — Краснодар, 1996. — С. 62–63.
6. Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Т. 3. — Владимир, 2005. — 400 с.
7. A comparison of avian mammalian cell cultures for the propagation of avian reovirus WVU 2937 / V. Barta, W.T Springer, D.L Millar // Avian Dis. — 1984. — Vol. 28, N 1. — P. 216–223.
8. Adaptation and characteristics of replication of a strain of avian reovirus in vero cells / G.E. Wilcox, M.D. Robertson, A.D. Lines // Avian Pathol. — 1985. — Vol. 14. — P. 321–328.
9. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chicken / A.A.W.M. van Loon, H.C. Koopman, W. Kosman [et al.] // Vet. Quart. — Vol. 23, №3. — 2001. — P. 129–133.

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



Вирусвакцина против болезни Марека «Маривак 1+3» является отечественным аналогом зарубежных вакцин против болезни Марека из 1 и 3 серотипов вируса, содержащего 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 высоко вирулентных (vv) и высоко

вирулентных плюс (vv+) штаммов вируса БМ и может успешно использоваться 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, лимфопролиферативное, 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.