

**Вирус африканской чумы свиней:
культивирование, свойства, индикация**

УДК 636.4:619:578.835.2:57.083

doi: 10.15389/agrobiology.2014.4.58rus

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВЫРАЩИВАНИЯ
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
КЛЕТКАХ**

Н.И. ЗАКУТСКИЙ, Т.Г. ШИРОКОВА, Н.С. НЕВЕРОВСКАЯ, С.Г. ЮРКОВ

По вопросам технологии получения вируса африканской чумы свиней (АЧС), в частности об используемых методах культивирования, в доступной литературе имеется весьма ограниченное число публикаций. Кроме того, выбор эффективных клеточных систем также лимитирован. Статья посвящена разработке и сравнительной оценке эффективности приемов выращивания вируса африканской чумы свиней (АЧС) в культурах клеток костного мозга (КМС) и лейкоцитов (ЛС) свиней. Показана возможность использования клеточной суспензии, изготовленной из костного мозга свиней после 24 ч хранения при 4-6 °С, для выращивания вируса АЧС. Вирус, полученный в такой клеточной суспензии, не снижал инфекционной активности и накапливался в титрах 7,25-7,50 lg ТЦД₅₀/см³. Изучены условия выращивания вируса АЧС в гемопоэтических клетках с применением стационарных аппаратов типа КАСМ (кассетный аппарат для монослойного культивирования), роллерного способа культивирования в круговом монослое и в суспензии клеток, а также биологических реакторов (ферментеров) для суспензионного культивирования. Во всех вариантах вирус АЧС стабильно накапливался в клетках КМС и ЛС в высоких титрах (7,25-8,00 lg ГАЕ₅₀/см³). Однако наиболее эффективным, технологичным и производительным оказалось выращивание вируса АЧС в суспензии гемопоэтических клеток в автоматизированных реакторах. В этом случае титр вируса достигал 7,50-8,00 lg ГАЕ₅₀/см³. Анализируя результаты исследований, можно сделать вывод, что перечисленные методы в сравнении с накоплением вируса АЧС в стационарной культуре клеток в матрасах более эффективны и могут применяться при крупномасштабном культивировании этого биоагента с целью получения препаратов для вакцинации и диагностики при АЧС.

Ключевые слова: африканская чума свиней, АЧС, вирус АЧС, культура клеток костного мозга свиней, культура клеток лейкоцитов свиней, КМС, ЛС, аппарат для стационарного монослойного культивирования, аппарат КАСМ.

На протяжении многих лет в вирусологической практике широко применяют выращивание вирусов в пристеночных культурах клеток с использованием матрасов, аппаратов, роллерных установок и др. Разработаны также методы для выращивания клеток и вирусов в суспензионной культуре в роллерных установках и ферментерах разной производительности с целью лабораторных исследований и получения биопрепаратов (1-6). Преимущество суспензионного культивирования заключается в применении микробиологической техники с ферментерами большого объема, что обеспечивает повышение производительности, экономию питательной среды, возможность осуществлять процесс культивирования в контролируемых условиях за счет поддержания основных технологических параметров в необходимом режиме (7-10). Анализируя специальную литературу, следует отметить, что усилия исследователей направлены на обеспечение максимальной реализации потенциала клеток посредством создания условий их культивирования, приближенным к таковым *in vivo* (8, 10-12).

По вопросам технологии получения вируса африканской чумы свиней (АЧС) в доступной литературе имеется весьма ограниченное число публикаций, и в частности это касается методов культивирования. Число эффективных клеточных систем невелико, так как практическое применение нашли в основном культуры клеток костного мозга свиней (КМС) и лейкоцитов свиней (ЛС). К тому же часто при получении суспензии клеток КМС из-за непредвиденных обстоятельств приходится использовать

кости свиней как источник клеток КМС не сразу, а после разных сроков хранения, для чего требуется изучить вирусрепродуцирующие свойства таких клеток.

Нашей целью была разработка и сравнительная оценка эффективности методов выращивания вируса африканской чумы свиней в различных культурах клеток костного мозга и лейкоцитов свиньи.

Методика. В эксперименте использовали вирус АЧС штамм ФК-135, прошедший не более 10 пассажей в культуре клеток костного мозга свиньи (активность 7,00-7,75 lg ГАЕ₅₀/см³).

Суспензию клеток КМС получали от поросят 3-4-месячного возраста с помощью полуавтоматической установки для измельчения костей (изготовитель Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии — ВНИИВВиМ) по разработанной нами методике. Суспензию клеток ЛС готовили предложенным нами способом с применением устройства для выделения плазмы крови свиней. Полученную плазму центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин, осадок клеток разбавляли 0,1 % гидролизатом лактальбумина (ГЛА) до рабочей плотности 10^{5,0-6,0} кл/см³, добавляли 5-10 % свиной сыворотки крови (от общего объема суспензии), а также 7,5 % раствор соды (до рН среды 7,6), антибиотики пенициллин и стрептомицин (по 100 Ед/см³) и канамицин (50 Ед/см³).

Для поддержания культур клеток КМС и ЛС питательной средой служил 0,1 % ГЛА на основе раствора Эрла с добавлением сыворотки крови свиней, 10 % раствора глутамина, 7,5 % раствора бикарбоната натрия (для обеспечения необходимых значений рН), антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, канамицин); использовалась роллерная установка в стандартном режиме («NBS», США).

Выращивание клеток и вируса АЧС проводили в монослойной и суспензионной культуре клеток КМС и ЛС. Культивирование осуществляли различными способами: в 1,5-литровых стеклянных матрасах; в 2-литровых бутылках на роллерной установке для монослойно-суспензионного культивирования («NBS», США); в 3-5-литровых бутылках на роллерной установке для суспензионного культивирования (разработана во ВНИИВВиМ); в кассетных аппаратах для стационарного монослойного культивирования (КАСМ), в биологических реакторах (ферментерах) вместимостью 2-5 л («NBS», США).

В процессе выращивания вируса и инкубирования интактной культуры ежедневно отбирали пробы для определения жизнеспособности и числа клеток, величины рН, инфекционной активности вируса и стерильности (2, 7).

Результаты. Способность репродуцировать вирус АЧС у клеток КМС, полученных после хранения костей. Мы изучили чувствительность к вирусу АЧС у клеток КМС, извлеченных из костей, которые разное время хранились при температуре 4-6 °С. С указанной целью позвонки поросят массой 25-35 кг освобождали от мягких тканей и помещали в холодильник при 4-6 °С на 24, 36 и 48 ч, после чего из них готовили клеточные суспензии КМС. Контролем служила суспензия клеток костномозговой ткани, полученная без предварительного хранения костей. Выращивание вируса осуществляли в 2-литровых бутылках в суспензии роллерным методом при следующих условиях: исходная плотность суспензии клеток КМС — 3,0 млн/мл, множественность заражения — 0,1 ГАЕ₅₀/кл., коэффициент заполнения сосудов — 0,33; температура культивирования 37 °С, величина рН 7,2-7,4; скорость вращения бутылок —

10-12 об/мин, продолжительность культивирования 4 сут.

Установлено, что отмирание интактных клеток в контроле и после хранения биологического материала в течение 24, 36 и 48 ч происходило неодинаково. Сопоставимую жизнеспособность интактных клеток на протяжении всего периода культивирования отмечали в свежеприготовленной суспензии и в образце, полученном после 24 ч хранения костей. В более поздние сроки хранения жизнеспособность клеток снижалась. Вирус накапливался равнозначно в контрольной культуре клеток и в клетках костномозговой ткани, хранившейся в течение 24 ч. При этом титр вируса достигал 7,25-7,50 lg ГАЕ₅₀/см³. При выращивании в клетках, извлеченных из костей после 36- и 48-часового хранения, урожай вируса не превышал соответственно 6,50 и 6,00 lg ГАЕ₅₀/см³.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности накапливать вирус АЧС в клеточной суспензии, полученной из костного мозга свиней после 24 ч хранения костей при температуре 4-6 °С.

Выращивание вируса АЧС в стационарном аппарате КАСМ и в круговом монослое клеток КМС. Метод выращивания вируса АЧС в монослойной культуре клеток КМС и ЛС считается наиболее простым и доступным (2). Для получения вируса АЧС в субстрат-зависимой культуре клеток чаще всего используют стеклянные и пластиковые матрасы, что позволяет получать вирусосодержащий материал в любой лаборатории для исследовательских целей. Как более сложный вариант накопления вируса в стационарном монослое клеток рассматривается применение устройств, оборудования и аппаратов для культивирования, оснащенных множеством пластин, кювет и других твердых субстратов, позволяющих значительно увеличить полезную поверхность культиваторов (2).

В сравнительных опытах мы изучали эффективность применения традиционных методов выращивания вируса АЧС в монослое клеток КМС с использованием 1,5-литровых стеклянных матрасов, вращающихся бутылей и экспериментального аппарата КАСМ, разработанного и изготовленного во ВНИИВВиМ. Этот аппарат выполнен из нержавеющей стали, состоит из металлического сосуда и 12 титановых кювет, которые расположены горизонтально и крепятся на четырех стойках. Аппарат снабжен пробоотборником и устройством для аэрации, выполненными в виде металлических трубок, которые расположены вертикально и соприкасаются с днищем аппарата. На крышке имеются отверстия со штуцерами, соединенными силиконовыми трубками, для загрузки-отгрузки клеточной или вирусосодержащей суспензии, подачи воздуха через фильтр для поверхностной аэрации. Аппарат стерилизуют в автоклаве в режиме 2 атм. в течение 2 ч. Загрузку клеточной суспензии осуществляют с помощью сифона, состоящего из 15-литровой бутылки и резиновой пробки с двумя вмонтированными силиконовыми трубками (одна трубка соединяется с пробоотборником, а другая — с фильтром). При загрузке-отгрузке суспензии через фильтр подается сжатый воздух. Производительность аппарата за один цикл составляет 12 л биоматериала.

При сравнении эффективности пристеночных методов культивирования изучали условия выращивания вируса АЧС в стационарной монослойной культуре клеток КМС в аппарате КАСМ, в круговом монослое клеток в 2-литровых бутылках на роллерном аппарате фирмы «NBS» (США) и в 1,5-литровых матрасах (контроль). Плотность посевной суспензии клеток КМС в питательной среде (0,1 % ГЛА на основе раствора Эрла с 10 % свиной сыворотки, рН 7,5-7,6) составляла 2,8-3,0 млн/см³. В

суспензию клеток вносили комплекс антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, канамицин) в указанных выше дозах.

Для выращивания вируса клетки предварительно культивировали в аппарате КАСМ в течение 2 сут при следующих условиях: объем заполнения — 12 л; температура 37 °С, рН 7,2-7,4. Через 2 сут среду меняли (культуральную среду из аппарата отгружали). В свежую среду вносили вирус в объемном соотношении 1:100, тщательно перемешивали и загружали в аппарат 12 л вирусосодержащего материала, после чего культивировали в течение 4 сут при 37 °С (рН 7,2-7,4). В процессе культивирования (на 2-е и 3-и сут) осуществляли периодическую подачу воздуха (2 раза в сутки по 15 мин) с целью аэрации и поддержания рН. По окончании культивирования аппарат перемещали вперед-назад под углом 30-45° в течение 2-3 мин для смыва остатка монослоя и отгружали вирусный материал в бутылку с сифоном посредством подачи воздуха через фильтр.

На роллерной установке и в матрасах вирус культивировали в 2-суточной культуре клеток КМС при коэффициенте заполнения бутылей и матрасов 0,16-0,17 и скорости вращения бутылей 12 об/ч. Плотность посевной суспензии — $3,0 \times 10^6$ кл/см³, доза заражения — 0,1 ГАЕ₅₀/кл., рН 7,2-7,4, температура 37 °С. Как и в аппарате КАСМ, вирус культивировали в течение 4 сут.

Результаты исследований показали, что динамика накопления вируса в культуре клеток КМС в аппарате и в круговом монослое клеток была одинаковой и конечные титры в обоих случаях достигали в среднем 7,50 lg ГАЕ₅₀/см³, тогда как в матрасах его активность не превышала 7,00 lg ГАЕ₅₀/см³. В то же время производительность аппарата оказалась значительно выше (он заменял соответственно 60 матрасов и 20 роллерных бутылей). Эффективность КАСМ была подтверждена в четырех независимых опытах.

Таким образом, установлено, что аппараты типа КАСМ могут успешно использоваться для выращивания вируса АЧС в клетках КМС в стационарных условиях, обеспечивая более высокую производительность и эффективность в сравнении с матрасами.

Мы также изучили условия выращивания вируса АЧС в круговом монослое клеток КМС и ЛС с использованием роллерной установки и 2-литровых сосудов. Опыты показали, что оптимальная плотность посевной клеточной суспензии для ЛС в 2 раза выше, чем для КМС. При этом установлено, что в вариантах с КМС и ЛС вирус в максимальных титрах накапливался при множественности заражения соответственно 0,01-1,00 и 0,0010-0,0001 ГАЕ₅₀/кл. Двухсуточные клеточные культуры с посевной плотностью 2,8-3,0 млн/мл (КМС) и 5,0-6,0 млн/мл (ЛС) заражали вирусом в объемном соотношении соответственно 1:100 и 1:10000 и инкубировали при 37 °С, рН 7,2-7,4 и скорости вращения бутылей 12 об/ч в течение 4 сут. Контролем служим вариант, в котором вирус выращивали в этих же клетках в матрасах в аналогичных условиях. Полученные данные свидетельствовали, что в культурах клеток КМС и ЛС, поддерживаемых роллерным способом, инфекционная активность нарастала с одинаковой скоростью и титр вируса достигал 7,50 lg ГАЕ₅₀/см³. В вариантах, когда вирус накапливали в матрасах, его титры были на 0,25-0,50 lg ГАЕ₅₀/см³ ниже, чем при культивировании роллерным способом.

Выращивание вируса АЧС в суспензии клеток КМС и ЛС роллерным методом и в реакторах. Выше отмечалось, что в круговом монослое клеток вирус АЧС накапливался в более высоких титрах, чем в матрасах. Учитывая, что суспензионный метод культивирования

характеризуется более высокой производительностью по сравнению с монослойным, мы сравнили эффективности выращивания вируса АЧС глубинным способом в культурах клеток КМС и ЛС с использованием 5-литрового ферментера («NBS», США), роллерной установки для суспензионно-монослойного культивирования («NBS», США), а также роллерной установки для суспензионного культивирования (ВНИИВВиМ) и матрасов. Основные технологические параметры при суспензионном роллерном методе были теми же, что при выращивании соответствующих клеток и вируса в круговом (роллерном) монослое. Скорость вращения 3-5-литровых бутылей с суспензионной культурой составляла примерно 12 об/мин. В этом варианте не требовалось предварительного выращивания монослоя клеток, что в 2 раза уменьшало расход питательной среды и на 2 сут сокращало длительность процедуры. Культивирование вируса АЧС в ферментере осуществляли по разработанной нами технологии в течение 4 сут.

Как было установлено, накопление вируса АЧС в клетках КМС и ЛС при роллерном культивировании в суспензии практически не отличалось от такового в варианте с монослоем и титры вируса достигали 7,00-7,50 lg ГАЕ₅₀/см³. Однако необходимо отметить более высокую экономичность и технологичность роллерного способа получения вирусного материала. Кроме того, активность вируса при выращивании в этих же клетках в матрасах была на 0,25-0,5 lg ГАЕ₅₀/см³ ниже, чем при использовании роллерного метода.

При культивировании в ферментерах вирус АЧС накапливался в суспензии клеток КМС и ЛС до титров 7,50-8,00 lg ГАЕ₅₀/см³, иными словами, реакторный способ обеспечивал более высокие титры, чем остальные сравниваемые в настоящей работе методы.

Итак, вирус африканской чумы свиней (АЧС) накапливался в высоких титрах как в культурах клеток костного мозга свиней, так и в культурах лейкоцитов свиней (7,25-8,00 lg ГАЕ₅₀/см³) при применении каскадного аппарата для стационарного монослойного культивирования, в круговом монослое и в суспензии при роллерном методе, а также при культивировании в биологических реакторах. Следует отметить, что самым эффективным, технологичным и производительным приемом оказалось использование суспензии гемопоэтических клеток в реакторах. По сравнению с выращиванием вируса АЧС в стационарной культуре клеток в матрасах все перечисленные методы более эффективны и могут использоваться для разработки крупномасштабных технологий культивирования этого биоагента.

*ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной
вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии,*

601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
e-mail: vniivvim@niiv.petush.elcom.ru, patronn13@rambler.ru

*Поступила в редакцию
18 июня 2014 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 4, pp. 58-63

EFFICACY OF VARIOUS METHODS FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS GROWTH IN HEMATOPOIETIC CELLS

N.I. Zakutskii, T.G. Shirokova, N.S. Neverovskaya, S.G. Yurkov

*All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail vniivvim@niiv.petush.elcom.ru
Received June 18, 2014*

doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.58eng

Abstract

For African swine fever virus (ASFV) reproduction little publications are available, in

particular, those concerning cultivation technologies. Moreover, the range of effective cell systems for cultivation is limited too. This report highlights the development and comparative evaluation of methods for African swine fever virus (ASFV) growth in porcine bone marrow cell (PBM) and leukocyte (PL) cultures for their efficacy. We showed the possibility of using cell suspension prepared from porcine bone marrow after its 24-hour storage at 4 to 6 °C for ASFV culture. The virus grown in the PBM cell suspension after the abovementioned storage period for porcine bone marrow had expired did not reduce its infectious activity, and accumulated with titers of 7.25 to 7.50 lg TCID₅₀/cm³. The conditions for ASF virus culture in hematopoietic cells using stationary devices like KASM (a cassette unit for monolayer culture), a technique for roll-bottle culture in a circular monolayer or in a cell suspension, and biological reactors (fermentors) for a suspension culture were analyzed. When using these culture methods, ASF virus steadily accumulated in the PBM or PL cells with high titers ranging from 7.25 to 8.00 lg HAU₅₀/cm³. Nevertheless, ASF virus growth in hematopoietic cell suspensions using automated reactors was found to be the most effective, technologically advanced and productive technique. In this case, the virus titers were as high as 7.50 to 8.00 lg HAU₅₀/cm³. Analyzing the results of the studies we concluded that the above methods were more efficient as compared to ASFV growth in a stationary cell culture using flasks, and could be used for large scale cultivation of this biological agent in vaccinology and diagnostics of African swine fever infection.

Keywords: African swine fever, ASF, ASF virus, porcine bone marrow cell culture, porcine white blood cell culture, porcine bone marrow, porcine white blood cells, cassette unit for stationary monolayer culture.

REFERENCES

1. Balysheva V.I., Zakutskii N.I., Lapteva O.G., Gorshkova T.F., Balyshev V.M., Tsybanov S.Zh., Novikova M.B., Fedorov G.P., Dmitrenko V.V., Nesterov E.A. *Veterinariya*, 2008, 11: 20-23.
2. Golubev D.B., Somnina A.A., Medvedeva M.N. *Rukovodstvo po primeneniyu kletchnykh kul'tur v virusologii* [Cell cultures in virology: guidance for use]. Moscow, 1976.
3. Zakutskii N.I., Balysheva V.I., Shpyakin Yu.A. *Veterinariya*, 2011, 7: 24-27.
4. Kovalenko T.I., Zaval'nyi M.A. *Apparat dlya kul'tivirovaniya kletchnykh kul'tur v monosloe* (Institut poliomieliita i virusnykh entsefalitov AMN SSSR). A.S. 897859, SSSR, 1982 [Device for cell cultivation in monolayer (Institute of poliomyelitis and encephalitis AMS USSR). A.S. 897859, USSR, 1982].
5. Simonenko N.V. *Biologicheskaya kharakteristika shtamma VN-96 virusa transmissivnogo gastroenterita svinei i razrabotka biotekhnologicheskikh preparatov ego kul'tivirovaniya. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Biological characteristics of VN-96 strain of swine transmissible gastroenteritis virus and its cultivation. PhD Thesis]. Saratov, 2011.
6. Grin' S.A. *Sovremennye biotekhnologicheskie protsessy i immunologicheskie metody pri promyshlennom proizvodstve veterinarnykh preparatov. Avtoreferat doktorskoi dissertatsii* [Biotechnologies and immunological methods for industrial production of veterinary preparations. DSc Thesis]. Shchelkovo, 2008.
7. Zakutskii N.I. *Razrabotka i sovershenstvovanie tekhnologii izgotovleniya inaktivirovannoi vaksiny protiv infektsionnogo rinotrakheita krupnogo rogatogo skota. Doktorskaya dissertatsiya* [Technologies to produce inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. DSc Thesis]. Pokrov, 1998.
8. Kukushkina M.S. *Immunobiologicheskaya kharakteristika vaksinnnykh i virulentnykh shtammov virusov ospy ovets i ospy koz. Kandidatskaya dissertatsiya* [Immunobiological characteristics of vaccine and virulent strains of sheep and goat pox viruses. PhD Thesis]. Vladimir, 2008.
9. Pavlenko I.V. *Sovershenstvovanie promyshlennoi biotekhnologii proizvodstva sukhikh zhivnykh bakterial'nykh preparatov i otsenka ikh effektivnosti. Doktorskaya dissertatsiya* [Industrial biotechnology to produce dried live-bacteria preparations and an estimation of their efficacy. DSc Thesis]. Shchelkovo, 2013.
10. Balyshev V.M., Gorshkova T.F., Kalantaenko Yu.F. *Veterinariya*, 2009, 5: 55-56.
11. Dmitrenko V.V., Zakutskii N.I., Balysheva V.I. *Svinovodstvo*, 2011, 8: 64-66.
12. Karimullina I.G. *Optimizatsiya tekhnologii kul'tivirovaniya virusov paragrippa-3, infektsionnogo rinotrakheita i khlamidii pri razrabotke assotsirovannoi vaksiny. Kandidatskaya dissertatsiya* [Optimized cultivation of parainfluenza-3, rhinotracheitis viruses and Chlamydia to develop a combination vaccine. PhD Thesis]. Kazan', 2004.

Научные собрания

THE 2nd GENETICS AND GENOMICS CONFERENCE (GC 2014)

(13-15 июня 2014 года, г. Пекин, Китай)

Контакты и информация: <http://www.engii.org/workshop/GC2014June>, gc@engii.org