

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА ФК-135 ВИРУСА
АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ, ВЫРАЩЕННОГО
В СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЕЙ**

Н.И. ЗАКУТСКИЙ, Т.Г. ШИРОКОВА, С.Г. ЮРКОВ, В.М. БАЛЫШЕВ

Многие годы усилия исследователей были направлены на получение и испытание различных аттенуированных вариантов вируса африканской чумы свиней (АЧС) с целью разработки специфических средств профилактики. Аналогичные исследования проводились и во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, в результате чего В.А. Бурлаковым и др. (1979) пассированием в культуре клеток костного мозга свиней (КМС) вирулентного штамма Франция-32, относящегося к 4-му серотипу, был получен аттенуированный вариант вируса АЧС — ФК-135. Установлено, что 25-кратный концентрат этого штамма, выращенного в монослойной культуре клеток КМС, вызывал защиту 85-100 % подсвинков от заражения гомологичным вирулентным вирусом АЧС. Учитывая, что метод глубинного (суспензионного) культивирования технологичнее, производительнее и экономичнее монослойного, представляло интерес изучить антигенную и иммуногенную активность концентрированного эмульгированного вирусосодержащего препарата, который был получен на основе аттенуированного штамма ФК-135 вируса АЧС, накопленного в суспензии клеток КМС в биореакторах. Выполненные исследования показали, что при таком культивировании максимальное накопление вируса (7,50-8,00 lg ГАЕ₅₀/см³) наблюдали на 4-е сут, а КС-антитела (1:16-1:32) — на 5-6-е сут. Титр вируса, выращенного в монослое клеток КМС в матрасах, оказался на 0,25-0,50 lg ГАЕ₅₀/см³ ниже, чем в первом варианте, при слабом отличии по уровню КС-антител в эти же сроки (1:16). Концентрированный эмульгированный препарат на основе штамма ФК-135, выращенного в суспензии клеток КМС в биореакторах, через 7 сут после введения обеспечивал защиту подсвинков против заражения гомологичным вирулентным вирусом в течение 4 мес (срок наблюдения). При этом у привитых животных аттенуированный вирус выделяли из проб крови до 10-14-х сут. Отмечается, что суспензионный метод выращивания аттенуированного штамма ФК-135 в культуре клеток КМС в автоматизированных биореакторах позволяет в контролируемых условиях получать однородный вирусный материал с высокой биологической активностью.

Ключевые слова: африканская чума свиней, АЧС, вирус АЧС, культура клеток костного мозга свиней, клетки КМС, инфекционность, гемадсорбирующая и комплементсвязывающая (КС) активность, иммуногенность.

После заноса африканской чумы свиней (АЧС) на Европейский континент (1957 год) усилия многих исследователей были направлены на получение и испытание различных аттенуированных вариантов вируса АЧС с целью разработки специфических средств профилактики, так как инактивированные вакцины при этой болезни оказались неэффективными (1).

Аналогичные исследования проводились и во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ) (2-6). В ряде экспериментов было показано, что устойчивость свиней к заражению гомологичным вирулентным вирусом АЧС зависит от интенсивности проявления клинической реакции животных на иммунизацию аттенуированными штаммами. Штаммы вируса АЧС, вызывавшие умеренную клиническую реакцию у привитых особей, обеспечивали формирование устойчивости к заражению вирулентными штаммами гомологичных серотипов (3, 7, 8).

И.Ф. Вишняковым с соавт. (4) при пассировании вирулентного штамма Франция-32, относящегося к 4-му серотипу, в культуре клеток костного мозга свиней (КМС) был выделен аттенуированный вариант вируса АЧС — ФК-135. Вирусный материал, который получили на основе этого штамма, выращенного в монослойной культуре клеток КМС, после концентрирования в 25 раз по объему вызывал защиту 85-100 % подсвинков от заражения гомологичным вирулентным вирусом АЧС. Защита наступа-

ла уже через 7 сут после прививки (3).

В последнее время для получения вирусного сырья с целью изготовления вакцинных препаратов широкое распространение получили методы культивирования с использованием роллерных установок и автоматизированных биореакторов (9, 10).

В настоящей работе представлены результаты изучения антигенной и иммуногенной активности концентрированного эмульгированного вирусосодержащего препарата вируса африканской чумы свиней, выращенного в суспензии клеток костного мозга свиней.

Методика. В опытах использовали аттенуированный штамм ФК-135 вируса АЧС после 9-го пассажа в культуре клеток КМС и эпизоотический штамм Ф-32, прошедший 3 пассажа на свиньях, с инфекционной активностью соответственно 7,50 и 7,33 lg ГАЕ₅₀/см³.

Культуру клеток КМС выращивали на стандартной среде Игла MEM («Sigma», США) с двойной концентрацией аминокислот и витаминов, а также в среде на основе раствора Эрла, содержащей ферментативный гидролизат мышечных белков (0,25 % ФГМ-С, разработка ВНИИВ-ВиМ) с 10 % сыворотки крови свиней («БиолоТ», г. Санкт-Петербург). Выращивание вируса осуществляли в течение 4-6 сут в суспензии клеток КМС в автоматизированных биореакторах вместимостью 5 л («NBS», США) и 20 л («Chemar», Швейцария) при оптимальных условиях: плотность суспензии клеток КМС — $3,0 \times 10^6$ кл/см³, множественность заражения — 0,1 ГАЕ₅₀/кл., скорость вращения турбинной мешалки — 100-120 об/мин, рН 7,2-7,4, скорость подачи газовой смеси (воздух + СО₂) — 2 л/ч в расчете на 1 л суспензии. Через каждые 24 ч из реакторов отбирали пробы для определения стерильности культуры, величины рН, общего числа и жизнеспособности клеток, инфекционной и антигенной активности вируса (10). Для контроля вирус выращивали в монослое клеток КМС в матрасах с применением тех же сред и условий.

Полученную вирусосодержащую суспензию концентрировали в 25 раз (по объему) полиэтиленгликолем (ПЭГ, м.м. 6000), а затем эмульгировали, используя с этой целью адьювант (1:1), содержащий подобранные минеральное масло и эмульгатор. Из полученного в трех циклах выращивания вирусного материала приготовили три серии эмульгированного препарата. Определение инфекционной и антигенной активности вируса АЧС, а также серологические исследования концентрированного вирусосодержащего материала проводили по методикам, разработанным во ВНИИВВиМ (4). Иммуногенность трех серий препарата изучали на внутримышечно привитых подсвинках массой 25-35 кг. Животных (по 4 гол. на препарат) иммунизировали однократно по 1 см³ и через 7 сут после прививки заражали внутримышечно вирулентным вирусом штамма Ф-32 в дозе 10⁵ ГАЕ₅₀.

Результаты. Вирус АЧС (штамм ФК-135) в суспензии клеток КМС на 4-е сут культивирования в биореакторах накапливался в максимальных титрах (7,50-7,75 lg ГАЕ₅₀/см³), тогда как в монослое в матрасах (контроль) его инфекционная активность не превышала 7,00-7,25 lg ГАЕ₅₀/см³. Установлено, что комплементсвязывающая активность антигена вируса, выращенного суспензионным методом и в стационарном монослое клеток КМС, в эти же сроки культивирования характеризовалась показателями титров 1:8-1:16. Больше накопление комплементсвязывающего антигена (КС-антигена) вируса в суспензии клеток КМС наблюдали на 5-6-е сут (1:16-1:32), хотя его инфекционная активность при этом не повышалась. Представленные данные указывают на то, что

максимальное накопление КС-антигена вируса АЧС, выращенного в суспензии клеток КМС, происходило через 1-2 сут после того, как регистрировали наибольшую инфекционную активность. Препарат, полученный на основе аттенуированного штамма ФК-135 вируса АЧС (три независимые серии) для последующего тестирования на животных, был стерильным, а инфекционная и КС-активность в сериях характеризовалась значениями соответственно 7,50-7,75 lg ТЦД₅₀/см³ и 1:16-1:32.

После концентрирования в 25 раз по объему и эмульгирования титр вируса в образцах увеличился до 8,00-8,25 lg ТЦД₅₀/см³.

У двух из 12 привитых подсвинков на 3-и и 7-е сут после иммунизации регистрировали повышенную температуру (до 40,5 °С в течение 1-3 сут) без проявления других клинических признаков. После контрольного заражения у четырех подсвинков на 4-7-е сут отмечали подъем температуры тела до 41,2 °С в течение 1-3 сут без других признаков болезни. Непривитые (контрольные) животные (4 подсвинка) пали на 8-11-е сут после заражения с признаками и патологическими изменениями, характерными для АЧС.

У животных, привитых указанным препаратом, аттенуированный вирус АЧС выделяли из крови до 10-14-х сут в низких титрах (до 1,5-2,5 lg ГАЕ₅₀/см³). В моче и фекалиях в эти и более поздние сроки вирус АЧС не обнаружили. Кроме того, не наблюдали передачи вируса от привитых подсвинков интактным путем при их совместном содержании в течение 30 сут (срок наблюдения). В сыворотках крови привитых подсвинков через 14 сут выявляли комплементсвязывающие и преципитирующие антитела в титрах 1:4-1:8, а антител, задерживающих гемадсорбцию вируса, не обнаруживали (срок наблюдения 30 сут).

У привитых таким препаратом подсвинков, которых заражали через 4 мес вирулентным вирусом, специфическая защита сохранялась в течение всего срока наблюдения. После заражения вирулентным вирусом у 7 из 12 животных в период с 3-х по 4-е сут отмечали 1-2-суточное повышение температуры тела до 40,5-41,3 °С. Остальные подсвинки оставались клинически здоровыми. В контрольной группе животные пали на 7-е и 9-е сут, и у них регистрировали клинические проявления и патологические изменения, характерные для АЧС.

Таким образом, при культивировании аттенуированного штамма ФК-135 вируса африканской чумы свиней (АЧС) в суспензии клеток костного мозга свиней в биореакторах максимальное накопление вируса (7,50-7,75 lg ГАЕ₅₀/см³) происходило на 4-е сут, комплементсвязывающего антигена (1:16-1:32) — на 5-6-е сут. Концентрированный эмульгированный препарат, изготовленный на основе этого материала, через 7 сут после внутримышечного введения обеспечивал защиту подсвинков против заражения гомологичным вирулентным вирусом в течение 4 мес (срок наблюдения). При этом у привитых животных аттенуированный вирус выделяли из проб крови до 10-14-х сут. Следовательно, вирусосодержащее сырье, полученное суспензионным методом в биореакторах на основе штамма ФК-135, может быть использовано при изучении иммунного ответа животных и молекулярно-генетических свойств вируса АЧС, а также для сравнения с его изолятами, циркулирующими в настоящее время в Российской Федерации, в том числе с целью разработки приемов иммунопрофилактики.

Авторы благодарят заведующую библиотекой ВНИИВВиМ А.Н. Неволину за помощь в подборе и оформлении цитируемых ссылок литературы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко Я.Р., Сидоров М.А., Бурба Л.Г. Африканская чума свиней. М., 1972.
2. Hess W., Cox B., Heuschele W., Stone S. Propagation and modification of African swine fever virus in cell cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 1965, 110: 141-146.
3. Бурлаков В.А. Иммунобиологические свойства вируса и проблема разработки средств специфической профилактики африканской чумы свиней. Докт. дис. Покров, 1979.
4. Вишняков И.Ф., Митин Н.И., Петров Ю.И., Черятников Л.Л., Киселев А.В., Бурлаков В.А., Балышев В.М., Федорищев И.В., Моргунов Ю.П. Сероиммунологическая классификация природных изолятов вируса африканской чумы свиней. *Мат. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии»*. Покров, 1995: 141-143.
5. Киселев А.В., Рудобельский А.В., Зуев В.В. и др. Культуральные и иммунобиологические свойства аттенуированных вариантов вируса АЧС, выделенных из природных изолятов возбудителя в НРК. *Мат. науч. конф. ВНИИВВиМ «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии»*. Покров, 1992: 44-45.
6. Прудникова Е.И., Балышев В.М., Белянин С.А., Балышева В.И. Патогенные и иммуногенные свойства культурального вируса африканской чумы свиней. *Мат. Межд. науч.-практ. конф., посвященной 55-летию ВНИИВВиМ*. Покров, 2013: 54-57.
7. Калантаенко Ю.Ф., Жестерев В.И., Мищанин В.А., Балышев В.М. Аттенуированный штамм вируса африканской чумы свиней 2-го серотипа для разработки диагностических и вакцинных препаратов. Патент РФ № 2452511. А61К39/187 С12N7/00. Заявл. 16.11.2010. Оpubл. 10.06.2012. Бюл. № 16.
8. Репин В.И., Черятников Л.Л., Петров Ю.И., Киселев А.В. Реактогенные и иммуногенные свойства аттенуированного штамма Катанга-350 вируса АЧС. *Мат. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии»*. Покров, 1995: 140-141.
9. Рубан Е.А., Соловьев Б.В., Гунин М.А. Некоторые проблемы глубинного культивирования животных клеток в биореакторах. *Мат. Всерос. науч.-практ. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов»*. Щелково, 2000: 290-293.
10. Сливко И.А. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов ТС-80 и 7/1 БелНИЭВ-ВГНКИ вируса бешенства. Автореф. канд. дис. Покров, 2003.

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
24 апреля 2014 года

IMMUNOBIOLOGICAL FEATURES OF AN ATTENUATED AFRICAN SWINE FEVER VIRUS STRAIN FC-135 GROWN IN A PORCINE BONE MARROW CELL SUSPENSION

N.I. Zakutskii, T.G. Shirokova, S.G. Yurkov, V.M. Balyshev

All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Pокrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail vniivvim@niiv.petush.elcom.ru
Received April 24, 2014 doi: 10.15389/agrobiol.2014.4.70eng

Abstract

For many years, efforts of research scientists have been directed towards obtaining and testing of various attenuated variants of African swine fever (ASF) virus to develop specific methods for ASF prevention. Similar investigations were also carried out in the All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology which resulted in obtaining an attenuated ASF virus variant FC-135 through passaging a virulent strain France-32 of serotype 4 (V.A. Burlackov et al., 1979). The above strain grown in a porcine bone marrow (PBM) monolayer cell culture and taken at a 25-fold concentration provided 85 to 100 % protection from infection with a homologous virulent ASF virus. Because of higher manufacturability, performance and cost effectiveness of a suspension culture method as compared to those for a monolayer one, the investigation of antigenic and immunogenic activity of a virus-containing emulsified preparation produced in bioreactors from an ASF virus strain FC-135 grown in a PBM cell suspension was of some interest. The results of the reported research showed that when culturing the attenuated ASF virus strain FC-135 in PBM cell suspension in bioreactors, the highest virus accumulation levels of 7.50 to 8.00 lg HAU₅₀/cm³ were observed after 4 day cultivation, and CF-antibody levels of 1:16 to 1:32 were indicated after

5 to 6 day cultivation. The titers of the virus grown in a PBM cell monolayer in mattresses were 0.25 to 0.50 lg HAU₅₀/cm³ lower than those as seen in the previous case, although CF-antibody levels as observed within the same period were of 1:16. A concentrated emulsified preparation designed from the strain FC-135 grown in a PBM cell suspension using bioreactors provided protection of gilts against infection with a homologous virulent virus for 4 months (observation period). Also, we showed that the suspension method of the attenuated strain FC-135 culture in PBM cells using automated bioreactors, being more manufacturable, productive and cost-efficient as compared to the monolayer growth in mattresses, when applied under controlled conditions, provided production of homologous virus materials exhibiting high biological activity.

Keywords: African swine fever, ASF, ASF virus, porcine bone marrow cell culture, PBM cells, infectivity, haemadsorbing activity, complement-fixing (CF) activity, immunogenicity.

Адрес сайта журнала в Интернете — www.agrobiology.ru

Статьи, события, информация — 7500 просмотров за месяц

73 % — посетители из России, около 7 % — из США и Канады, 20 % — из других стран



КАРТА САЙТА

Сообщаем, что...

- В правилах оформления направлений к представлению рукописей произошли изменения
- На сайте открыт новый раздел - "Зарубежные публикации", в котором представлены публикации авторов журнала в зарубежных изданиях
- Изменился фактический адрес редакции. Корреспонденцию можно отправлять по адресу: 127434, Москва, Дмитровское шоссе, д. 11, оф. 343.
- Телефонный код редакции изменился на 499. Новые телефоны: (499) 976-32-73; (499) 977-88-19.
- В разделе "Архив" нашего сайта в открытом доступе представлены полнотекстовые версии статей с 2007 года.
- С 2010 года на нашем сайте размещаются англоязычные полнотекстовые версии основной части экспериментальных статей.

Включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) (по агрономии и лесному хозяйству, по зоотехническим и ветеринарным специальностям, а с 2007 года — также по биологическим наукам).

Динамичное развитие и высокий уровень публикаций определяют интерес к изданию и его признание в научной среде. Читатели журнала — ученые не только из России и стран СНГ, но и из Бразилии, Великобритании, Германии, Испании, Китая, Швейцарии, Японии.

С 1989 года журнал выходит двумя сериями: «Биология растений» (№№ 1, 3 и 5 — февраль, июнь и октябрь) «Биология животных» (№№ 2, 4 и 6 — апрель, август и декабрь)

Индекс журнала в Объединенном каталоге «Российские и зарубежные газеты и журналы» — 70804.

Подписка через Интернет-каталог.



От эксперимента — к практике



Всероссийский НИИ селекции и селектирования овощных культур



Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства



Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН



Биотехнологический научно-экспериментальный комплекс "ГосНИИсинтезбелок"

О журнале Новости Редсовет Правила Анонс Архив Книги События Услуги Реквизиты Подписка Партнеры Авторы Контакты

© 2009, «Сельскохозяйственная биология»
тел. +7 (499) 977-88-19
адрес: biologia.vniis-vesti.ru
Дизайн: Илья FАВЕР, программирование: журнал "Сельскохозяйственная биология"



Научные собрания

VI СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ И АССОЦИИРОВАННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИМПОЗИУМЫ

(15-20 июня 2014 года, г. Ростов-на-Дону)

Контакты и информация: info-vogis@bionet.nsc.ru