

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБКУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРС ВТОРОГО ГЕНОТИПА

BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS TYPE 2 REPRODUCTION IN EUKARYOTIC SUBCULTIVATED CELL LINES

R. Bubyakin
S. Kononova
I. Shumilova
E. Kurnenkova
E. Trofimova
E. Kuznetsova

Summary. The results of studies on the reproduction of BVDV genotype 2 (isolate «Chelyabinsk») in eukaryotic subcultivated cell lines (2–10 passages) of lamb testicles, lamb kidney, goat kidney obtained as a result of trypsinization of the kidneys and testicles of lamb and goat kidney are presented. The results obtained indicate the successful reproduction of the pathogen under study in LT, LK, GK subcultivated cell lines. The activity of the virus by the fifth passage was 5.23 ± 0.18 lg TCID₅₀/cm³ in LT cell culture, 5.33 ± 0.14 lg TCID₅₀/cm³ in LK cell cultures and 5.25 ± 0.17 lg TCID₅₀/cm³ in GK cell culture. Accounting the problem of BVDV-free cell lines searching, the using of subcultivated cell lines with growth from primary trypsinized populations for 25–30 passages in modern conditions provide active viral material even on a production scale.

Keywords: subcultivated cell lines, BVDV (Bovine viral diarrhea virus), cytopathic effect, tissue culture infectious dose (TCID), multiplicity of infection (MOI).

Бубякин Роман Игоревич

Аспирант, ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (г. Владимир)
bubyakin@arriah.ru

Кононова Светлана Владимировна

Научный руководитель, к.б.н., ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (г. Владимир)
kononova@arriah.ru

Шумилова Ирина Николаевна

к.вет.н., ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (г. Владимир)
shumilova@arriah.ru

Курненкова Елена Викторовна

к.вет.н., ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (г. Владимир)
kurnenkova@arriah.ru

Трофимова Елена Александровна

ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (г. Владимир)
trofimova_ea@arriah.ru

Кузнецова Елена Геннадиевна

к.б.н., ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных» (г. Владимир)
kuznetsova_eg@arriah.ru

Аннотация. Представлены результаты исследований по репродукции вируса вирусной диареи КРС второго генотипа (изолят «Челябинск») в субкультивируемых культурах клеток (2–10 пассажей), таких как ТЯ (тестикулы ягненка), ПЯ (почка ягненка), ПК (почка козленка), полученных в результате трипсинизации почек и тестикул ягненка и почки козленка. Полученные результаты свидетельствуют об успешном размножении изучаемого возбудителя в субкультурах ТЯ, ПЯ, ПК. Активность вируса к пятому пассажу составляла $5,23 \pm 0,18$ lg ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток ТЯ, $5,33 \pm 0,14$ lg ТЦД₅₀/см³ в культурах клеток ПЯ и $5,25 \pm 0,17$ lg ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток ПК. Учитывая проблему поиска клеточных линий, свободных от контаминации нецитопатогенными вариантами вируса ВД КРС, использование субкультивируемых клеток, которые в современных условиях возможно выращивать из первично трипсинизированных популяций в течение 25–30 пассажей, позволяет получить активный вирусный материал даже в производственных масштабах.

Ключевые слова: субкультивируемые клетки, вирус вирусной диареи КРС, цитопатическое действие, инфекционная активность, множественность заражения.

Введение

Вирусная диарея крупного рогатого скота (ВД КРС) широко распространена во многих странах мира, имеет разное клиническое проявление от субклинических форм персистентной инфекции до острого поражения слизистой оболочки кишечника, острой диареи, тяжелой пневмонии, нарушения развития плода и т.д. [7, 16]. Вирус также может проходить через плаценту, что вызывает внутриутробное заражение плода, у которого развивается персистентная инфекция. Это приводит к рождению иммунотолерантных телят, которые выделяют вирус в окружающую среду в течение всей жизни и таким образом, являются распространителями инфекции [13, 17].

В настоящее время известны три генотипа вируса ВД КРС [1, 2, 4, 5]. Большинство известных штаммов ВД относится к 1 генотипу, а возбудители, относящиеся ко 2 генотипу, имеют более высокую вирулентность [6, 14]. Каждый генотип вируса может существовать в виде цитопатогенного и нецитопатогенного биотипов, которые различаются между собой генетически и иммунологически [17]. Получение вирусного материала на основе 2 генотипа вируса ВД КРС является на сегодняшний день актуальной задачей, поскольку на территории РФ нет коммерческих препаратов на основе этого возбудителя [4, 6].

Несмотря на то, что вирус ВД КРС обладает способностью инфицировать широкий спектр клеточных культур, что коррелирует с разнообразным симптоматическим проявлением инфекции у животных, выбор клеточной системы затруднен наличием контаминации клеточных культур нецитопатогенными биотипами вируса ВД КРС [3, 11]. Нечитопатогенный контаминант клеточных культур вызывает хроническую инфекцию клеток без развития цитопатического эффекта, что затрудняет его обнаружение и приводит к ложным результатам диагностических исследований, а также получению контаминированных противовирусных вакцин, которые могут стать потенциальным источником вируса для восприимчивых животных [2, 11]. Вирус может контаминировать сыворотку крови, ростовые среды, трипсин и другие препараты, используемые при культивировании клеток [3, 9, 15, 19].

Для изготовления средств специфической профилактики и диагностики против многих заболеваний животных используют перевиваемые линии клеток, которые более технологичны и стабильны, чем первичные и субкультивируемые клетки. Однако, большая часть перевиваемых культур клеток состоит из неоднородных в генетическом и физиологическом отношении клеточных элементов, что не гарантирует стабильности результатов при вирусологических исследованиях даже при соблюдении неизменных способов культивирования [8]. Также, особую озабоченность для вирусологов и специ-

алистов в области клеточной биотехнологии вызывают сообщения исследователей о контаминации клеточных линий посторонними микроорганизмами, в частности вирусом ВД КРС [9]. Использование субкультивируемых линий представляется перспективным направлением для наработки посевных материалов вируса ВД КРС, при условии соблюдения постоянного контроля качества всех компонентов (культур клеток, сыворотки, питательных сред и т.д.), используемых при их получении [12, 18].

Целью данной работы было изучение возможности использования субкультивируемых линий клеток для получения активного вирусного материала и оптимизация параметров культивирования вируса ВД КРС второго генотипа в этих клеточных системах.

Материалы и методы

Вирусный материал. В работе использовали изолят «Челябинск» вируса ВД КРС второго генотипа, который был выделен в Челябинской области из проб носовых истечений у теленка месячного возраста с респираторной дисфункцией.

Определение инфекционной активности полученного вирусного материала проводили в реакции титрования с использованием клеточной линии ТЯ. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Культура клеток. Культивирование вируса проводили в субкультурах 2–10 пассажей (ТЯ, ПК, ПЯ). Клеточные линии получали из отдела культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Питательные среды. В качестве ростовой среды для субкультур клеток использовали смесь питательных сред ПСП и 199 в соотношении 3:1 с добавлением 10 % сыворотки КРС, обработанной лантаноидами [10]. В качестве поддерживающей среды при культивировании вируса применяли питательную среду ПСП.

Все компоненты, используемые при культивировании клеток, а также клеточную суспензию предварительно исследовали на отсутствие контаминации вирусом ВД КРС методом ПЦР.

Для выявления генома вируса ВД КРС использовали праймеры, амплифицирующие участок 5'-UTR. Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), согласно инструкции изготовителя.

Результаты и обсуждения

Для изучения репродукции вируса ВД КРС (изолят «Челябинск») в субкультурах ТЯ, ПЯ и ПК проводили се-

рию последовательных пассажей с целью адаптации возбудителя к данным клеточным линиям.

Культура клеток ТЯ была непосредственно использована при выделении вируса ВД КРС из патологического материала, в результате чего был получен изолят «Челябинск» вируса ВД КРС второго генотипа. Сама субкультура была получена в результате трипсинизации яичек 2-месячного ягненка и последующего пассирования *in vitro*. Данная линия в настоящее время широко используется как при выделении многих вирусов, так и при их культивировании, состоит из полигональных, эпителиоподобных и веретенообразных клеток (рис. 1). Цитопатическое действие вируса в данной клеточной системе характеризовалось округлением и отслаиванием клеток от стекла. В оставшихся адгезированных веретенообразных клетках повышалась гранулярность (рис. 2).

Субкультура клеток ПЯ была получена в результате трипсинизации почек ягненка, возраст животного со-

ставлял 4–6 недель (рис. 3). Традиционно первично-трипсинизированную культуру клеток ПЯ используют для выделения вируса ВД КРС из биоматериалов. Для проведения наших работ использовали 48–96 ч субкультуру клеток ПЯ, 3–10 пассажей, с конфлюэнтным монослоем. В 1-ом пассаже изменений в культуре клеток ПЯ не наблюдали, начиная со второго пассажа выявляли незначительные изменения морфологии клеток, такие, как их округление и отделение клеток от субстрата. В третьем пассаже отмечали характерное цитопатическое действие, характеризующееся образованием сферических клеток, которые соединялись в дуплеты, однако значительное количество клеток сохранялось на подложке (рис. 4).

Субкультура клеток ПК была получена в результате трипсинизации почек козленка, возраст животного составлял 4–6 недель. Клетки культуры ПК имеют крупные размеры, они отличаются полиморфностью (рис. 5). Цитопатическое действие вируса ВД КРС в субкультивируе-

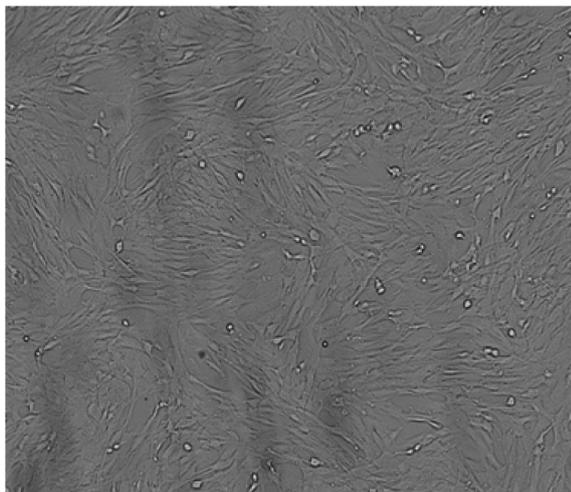


Рис. 1. Монослой субкультуры ТЯ

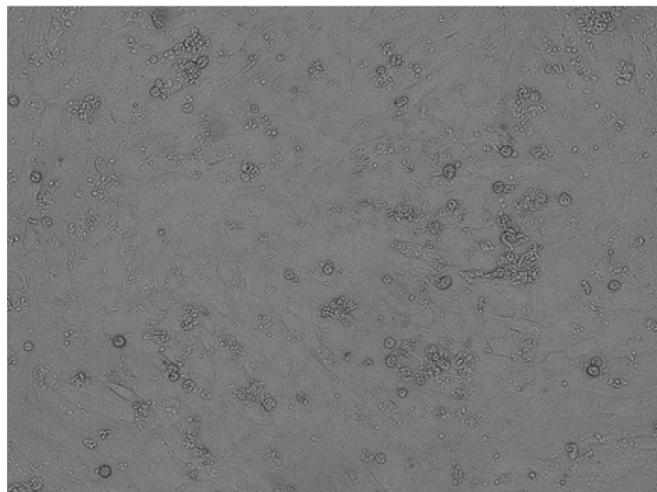


Рис. 2. ЦПД вируса ВД КРС в субкультуре ТЯ на 4-е сутки инкубирования

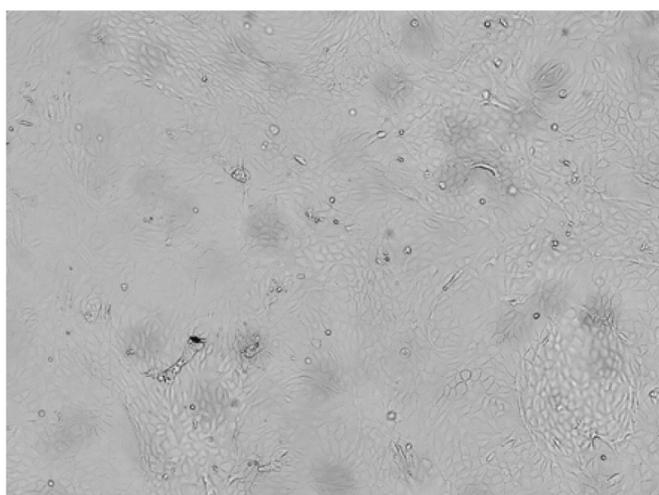


Рис. 3. Монослой субкультуры ПЯ

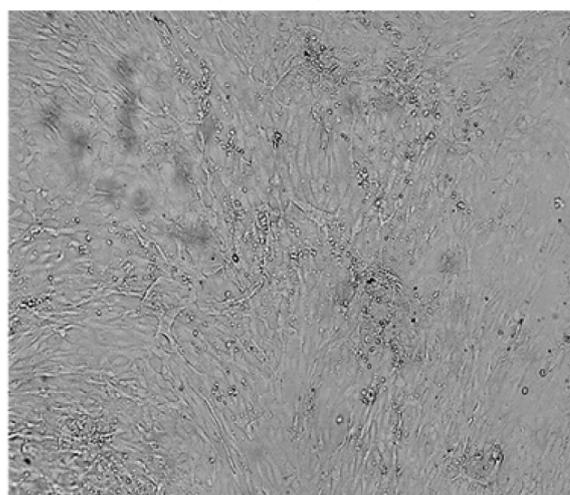


Рис. 4. ЦПД вируса ВД КРС в субкультуре ПЯ на 4-е сутки инкубирования

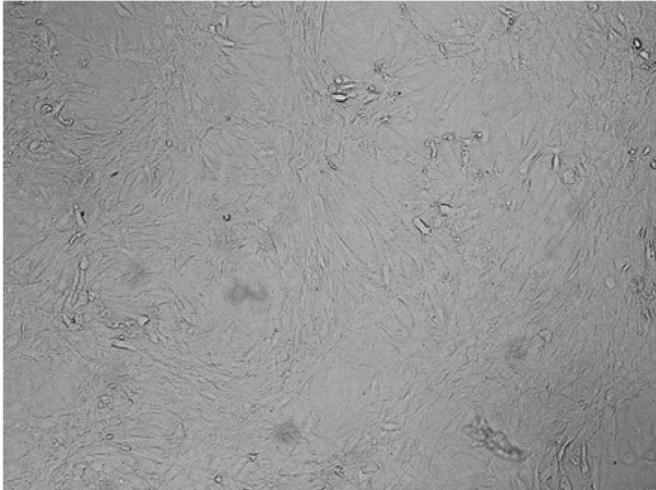


Рис. 5. Монослой субкультуры ПК

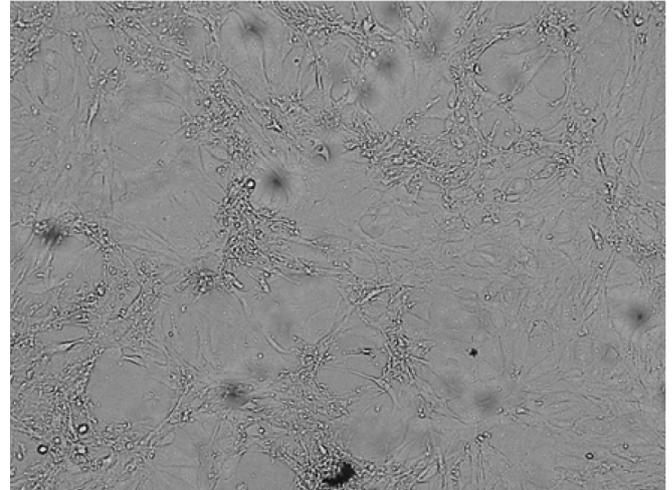


Рис. 6. ЦПД вируса ВД КРС в субкультуре ПК на 4-е сутки инкубирования

мых клетках ПК 2–10-го пассажей характеризовалось появлением мелкой зернистости, часть клеток принимала сферическую форму, монослой был разрежен (рис. 6).

Характер и интенсивность поражения монослоя в культуре клеток ПК были более выражены, чем в культуре клеток ПЯ.

В изучаемых клеточных культурах было проведено 5 последовательных пассажей. Результаты репродукции вируса ВД КРС представлены в Таблице 1.

Таблица 1.

Репродукция вируса ВД КРС в субкультивируемых клетках (n=3)

Вид субкультуры	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
ТЯ	5,25±0,17	5,25±0,17	5,48±0,16	5,26±0,17	5,23±0,18
ПЯ	4,33±0,16	5,00±0,25	5,18±0,22	5,22±0,08	5,33±0,14
ПК	4,07±0,05	5,03±0,18	5,26±0,25	5,00±0,00	5,25±0,17

Как видно из данных, представленных в таблице 1, накопление вируса ВД КРС в культурах клеток ТЯ, ПЯ и ПК находилось практически в одинаковых значениях и к пятому пассажу составляло 5,23±0,18 lg ТЦД₅₀/см³, 5,33±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,25±0,17 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно.

С целью оптимизации параметров культивирования вируса ВД КРС в культурах клеток ТЯ, ПЯ и ПК изучали влияние времени культивирования на репродукцию вируса (табл. 2).

Из данных таблицы 2 видно, что уровень накопления вируса ВД КРС в культурах клеток ТЯ, ПЯ и ПК через 96 и 120 ч культивирования существенно не различался и находился на уровне 5,25±0,17— 5,33±0,14 lg ТЦД₅₀/см³,

5,43±0,14 — 5,15±0,23 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,28±0,18 — 5,19±0,00 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно. Однако значительно превышал показатели, полученные через 24, 48 и 72 ч культивирования. Таким образом, оптимальным сроком культивирования вируса в изучаемых клеточных системах следует считать время 96–120 ч.

Таблица 2

Влияние времени культивирования вируса ВД КРС в субкультурах ТЯ, ПЯ, ПК (n=3)

Время культивирования, часы	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³		
	ТЯ	ПЯ	ПК
24	2,67±0,14	2,82±0,22	2,17±0,19
48	3,77±0,00	3,72±0,17	3,15±0,15
72	4,75±0,08	4,32±0,16	4,05±0,05
96	5,25±0,17	5,43±0,14	5,28±0,18
120	5,33±0,14	5,15±0,23	5,19±0,00

В следующей серии опытов изучали зависимость репродукции вируса от дозы заражения. В опыте использовали следующие дозы заражения: 0,001 ТЦД₅₀/кл, 0,01 ТЦД₅₀/кл, 0,1 ТЦД₅₀/кл и 1,0 ТЦД₅₀/кл, время культивирования вируса составляло 96 ч. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Определение оптимальной дозы заражения вируса ВД КРС в субкультурах ТЯ, ПЯ и ПК (n=3)

Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³		
	ТЯ	ПЯ	ПК
0,001	4,81±0,08	4,87±0,10	4,37±0,19
0,01	5,43±0,12	5,33±0,09	5,48±0,12
0,1	5,20±0,17	5,25±0,22	5,00±0,10
1,0	4,50±0,18	4,50±0,25	4,87±0,10

Как видно из полученных результатов, в указанных культурах клеток вирус накапливался примерно в одинаковых значениях при использовании дозы заражения от 0,01 до 0,1 ТЦД₅₀/кл, повышение дозы заражения до 1,0 ТЦД₅₀/кл приводило к некоторому снижению титра вируса. При использовании вышеперечисленных доз заражения время культивирования вируса составило 96 часов. Уменьшение множественности заражения до 0,001 ТЦД₅₀/кл приводило также к снижению инфекционной активности вируса и увеличению сроков наступления деструкции монослоя.

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что для успешной репродукции вируса ВД КРС второго генотипа (изолят «Челябинск») возможно ис-

пользование субкультивируемых клеток таких, как ТЯ, ПЯ и ПК. В данных клеточных системах вирус накапливался в стабильно высоком титре и к 5-му пассажу составлял $5,23 \pm 0,18 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (в культуре клеток ТЯ), $5,33 \pm 0,14 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (в культуре клеток ПЯ) и $5,25 \pm 0,17$ (в культуре клеток ПК). Оптимальное время культивирования вируса в изучаемых клеточных системах составило 96–120 часов, при использовании множественности заражения от 0,01 до 0,1 ТЦД₅₀/кл.

Указанные клеточные линии и установленные в них параметры культивирования позволяют получать высокоактивный вирусосодержащий материал, который в дальнейшем будет использован в целях изготовления средств диагностики и профилактики данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- Акимова О.А., Южаков А.Г., Корицкая М.А., Иванов Е.В., Джавадова Г.А., Глов А.Г., Глотова Т.И., Верховский О.А., Алипер Т.И. Выделение и идентификация вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 3-го типа в животноводческом хозяйстве Российской Федерации. *Ветеринария*. 2021; 7:17–22.
- Алексеев С.В., Юров Г.К., Гальнбек Т.В., Калита И.А., Юров К.П. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи крупного рогатого скота — необходимое условие производства биологических препаратов. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013; 1:15–18.
- Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами/ Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В. и др.// *Вопросы вирусологии*, 2012, 57, 5, 15–21.
- Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота / А.Г. Глов, Т.И. Глотова, А.Г. Южаков и соавт. // *Вопросы вирусологии*. — 2009. — № 5. — С. 43–47.
- Глов, А.Г. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота (обзор) / А.Г. Глов, Т.И. Глотова // *Сельскохозяйственная биология*. — 2015. — № 50. — 4. — С. 399–408.
- Глов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В., Нефедченко А.В., Семенова О.В. Вспышка заболевания крупного рогатого скота, вызванная вирусом диареи второго вида. *Ветеринария*. 2019; 3: 3–8. DOI: 10.30896/0042-4846.2019.22.3.03-08.
- Гулюкин М.И., Юров К.П., Глов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей — болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (6): 13–18.
- Мамаева С.Е., 1996. Закономерности кармотипической эволюции клеток в культуре. *Цитология*. 38 (8): 787–814.
- О контаминации клеточных культур вирусом диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV)/ Урываев Л., Дедова А., Дедова Л. и др.// *Бюл. эксп. биологии и медицины*, 2012, 153, 1, 88–93.
- Пономарев А.П., Белик Е.В., Манин Б.Л., Коган М.М. Способ очистки сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов. Патент №2664729 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС». — № 2017117994. Заявл. 23.05.2017. Опубл. 22.08.2018. Бюл. №24.
- Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом диареи КРС — необходимое условие производства биологических препаратов /Алексеев С.В., Юров К.П., Гальнбек Т.В. и др.// *РВЖ*. 2012, 1, 15–18.
- Сарбасов А.Б., Манин Б.Л., Яшин Р.В., Шумилова И.Н., Диев В.И. Изучение репродукции вирусов оспы овец и оспы коз в первичных и субкультивируемых клетках // *Ветеринария сегодня* — 2019. — №2. С.35–40.
- Стратегии борьбы с вирусной диареей КРС: экспертное мнение. *Аграрная наука*. 2019; (1): 14–16.
- Черных О.Ю., Мищенко А.В., Мищенко В.А., Шевкопляс В.Н., Джаилиди Г.А., Лысенко А.А. Экологические особенности возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота 1 и 2 генотипов. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2016; 61: 149–156.
- Genome analysis of an atypical bovine pestivirus from fetal bovine serum/ Gao S., Du J., Tian Z. et al.// *Virus Genes*, 2016, 52, 4, 561–563. Carman S., van Dreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10 (1): 27–35.
- Sasha R. Lanyon, Fraser I. Hill, Michael P. Reichel, Joe Brownlie. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis / *The Veterinary Journal* 199 (2014) 201–209
- Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 2003;31:137–43.
- Thornton D. H. A survey of mycoplasma detection in veterinary vaccines. *Vaccine*. 1986; 4: 237–240.
- Zabal O., Cobrak A. L., Lager I. A. et al. Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhoea virus. *Rev. Argent. Microbiol.* 2000; 32 (1): 27–32.

© Бубякин Роман Игоревич (bubyakin@arriah.ru); Кононова Светлана Владимировна (kononova@arriah.ru); Шумилова Ирина Николаевна (shumilova@arriah.ru); Курненькова Елена Викторовна (kurnenkova@arriah.ru); Трофимова Елена Александровна (trofimova_ea@arriah.ru); Кузнецова Елена Геннадиевна (kuznetsova_eg@arriah.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»