

УДК 57.082.26:616.71.018.46:619:616.98:578.842.1:616-07

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЬИ

Жуков И.Ю. аспирант Реф. лаб. по АЧС;
Шевченко И.В. аспирант Реф. лаб. по АЧС;
Варенцова А.А. аспирант Реф. лаб. по АЧС;
Бирюченков Д.А., к.в.н., научный сотрудник лаб.
профилактики болезней свиней и рогатого скота,
Пузанкова О.С. к.в.н., старший научный сотрудник
Реф. лаб. по АЧС;
Власова Н.Н., д.б.н., главный научный сотрудник
Реф. лаб. по АЧС;
Иголкин А.С. к.в.н., зав. Реф. лаб. по АЧС;
ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия.

Ключевые слова: *культура клеток костного мозга, африканская чума свиней.*

Введение. Африканская чума свиней (АЧС) – инфекционная вирусная болезнь парнокопытных семейства Suidae, которая характеризуется высокой летальностью и контагиозностью, сверхострым, подострым, острым и хроническим течением [1,3,5]. Вирус АЧС передается от больных животных и вирусоносителей контактным, алиментарным путем, а также трансплацентарно вызывая аборт и гибель плодов у супоросных свиноматок [2,3,11,12].

В России вспышки АЧС регистрируются на протяжении более чем 7 лет. Заболевание получило значительное распространение во многих регионах европейской части страны. Постоянная экспансия АЧС, с поражением популяций, как домашних, так и диких свиней, закрепление эндемичности в регионах, случаи выявления антител к ВАЧС у диких кабанов может свидетельствовать об изменении свойств возбудителя [2].

Для стандартизации диагностических, вирусологических и молекулярно-генетических исследований необходимы эффективные системы культивирования вируса АЧС. Естественно восприимчивыми к вирусу АЧС являются макрофаги периферической крови свиньи (МПКС), альвеолярных макрофагов легких свиньи (АМС) и клетки костного мозга свиньи, однако, культура клеток костного мозга (ККМС) отличается вы-

сокой продуктивностью и технологичностью [6,7,9]. Первичные культуры клеток имеют ряд недостатков, основным из которых является риск эндогенной вирусной контаминации, а также нестандартность доноров ткани, которые имеют неодинаковые физиологический и иммунологический статус [1,5, 10].

Наличие репродукции вируса АЧС в первичной культуре клеток выявляют по появлению гемадсорбции, которая характеризуется прикреплением к пораженным клеткам эритроцитов свиней. Данный феномен является дифференцирующим признаком, характерным для вируса АЧС, и проявляется при достижении значений титра вируса 4,0-4,5 Ig ГАЕ50/см³, в то время как инфекционная активность различных штаммов и изолятов вируса АЧС после 2 – 3 пассажей в ККМС достигает 7,0 – 7,5 Ig ГАЕ50/см³ [2,3,6].

Материалы и методы. Для получения ККМС использовали здоровых свиней крупной белой породы живой массой 15-20 кг. Для приготовления культуры клеток ККМС использовали костный мозг, отобранный из эпифизов крупных трубчатых костей (плечевой, лучевой, бедренной и большеберцовой). Для первичной обработки использовали раствор Хенкса с добавлением гентамицина (50 мкг/см³).

При посеве на культуральные пластиковые флаконы (25 и 75 см²) применяли поддерживающую питательную среду ПСП [5]. Для лучшей адгезии клеток на поверхности флаконов в питательную среду добавляли нормальную свиную сыворотку. Подсчет концентрации клеток в суспензии проводили с использованием камеры Горяева [4].

Результаты исследований и обсуждение. За основу метода был взят регламент согласно ГОСТ 28573 – 90, использование которого позволило адаптировать предлагаемую методику к условиям референтной лаборатории.

После проведенных исследований процесс получения культуры ККМС представлен следующими этапами:

1. Кости отделяли от мышечной ткани, отчищали от сухожилий и обрабатывали 3% раствором H₂O₂ после чего удаляли суставные поверхности. Для извлечения костного мозга кости раскалывали, и помещали в стерильный раствор Хенкса с добавлением гентамицина, трипсина (6 мл/400 мл р-ра) (0,002%), емкость помещали на качалку с амплитудой 600 колебаний/мин 30 мин при 37°C.

2. Для очистки ККМС от примесей, отобранный после отмывки раствор расфасовывали по стерильным центрифужным пробиркам по 50 мл и центрифугировали в течение 20 мин при 2000 об./мин, после

удаления надосадочной жидкости осадок клеток ресуспензировали в растворе Хенкса в малом ($45-50 \text{ см}^3$) объеме того же раствора.

3. Суспензию повторно осветляли центрифугированием. Осуществляли промежуточный контроль качества полученной суспензии клеток между этапами центрифугирования и проводили микроскопирование на наличие примесей и клеточных конгломератов.

4. При необходимости проводили повторное центрифугирование при условиях, описанных выше. После третьего центрифугирования суспензию фильтровали через 8 слоев стерильной марли и ресуспензировали пипеткой объемом 1-2 мл для предотвращения образования клеточных конгломератов.

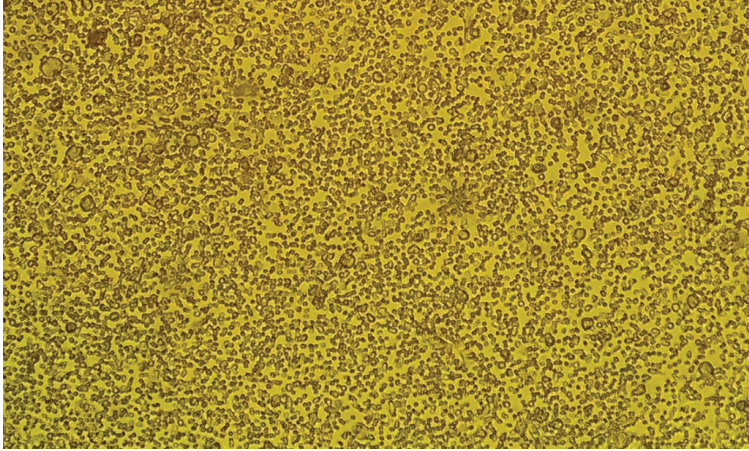
5. После отчистки суспензии производили подсчет концентрации клеток в камере Горяева. В поле зрения микроскопа наблюдали мелкие и крупные клетки. При этом подсчет проводили только крупных клеток (мелкие клетки - эритроциты).

6. Далее полученные клетки ресуспензировали в ростовой питательной среде ПСП с гентамицином (50 мкг/см^3) и нормальной свиной сывороткой (10%). Культуральные флаконы помещали в термостат на ночь для адгезии клеток на поверхности флаконов. На следующие утро производили замену питательной среды, удаляя неприкрепившиеся клетки и посторонние примеси из культурального флакона. В качестве поддерживающей среды использовали среду ПСП с гентамицином и нормальной свиной сывороткой (2%).

Для подбора оптимального разведения суспензии клеток использовали несколько посадочных концентраций клеток: 8, 4, 2 и 1 млн/см^3 . Для дальнейших исследований оптимальной оказалась концентрация 2 млн/см^3 .

Таким образом, полный цикл приготовления культуры ККМС занимал около 5 – 6 часов: от убоя подсвинка до посева суспензии клеток в культуральные флаконы. Концентрация клеток при этом должна составлять 2 млн./см^3 .

Через сутки после смены среды культура ККМС была пригодна для культивирования вируса АЧС.



**Рисунок 1 - Полученная культура ККМС на 2 сутки.
Увеличение 200 раз.**

Для проверки репродуктивной эффективности ККМС при культивировании вируса АЧС заразили 3 различных партии культуры вирусом изолята Богучары (статья Сравнительный анализ...) в дозе 10^4 ГАДЕ $50/\text{см}^3$ на матрас объемом 750 см^3 . На 5-6 сутки в полученных образцах определили титр инфекционной активности вируса в реакции гемадсорбции.

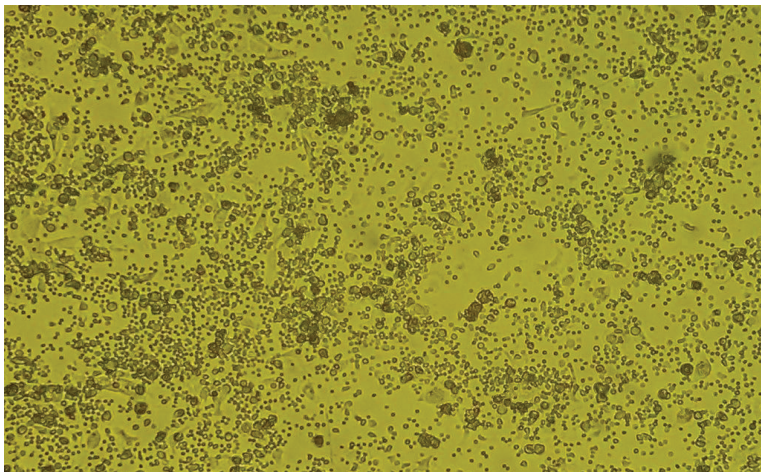


Рисунок 2 - Гемадсорбция на ККМС. Увеличение 200 раз.

Как видно из рисунка 2 гемадсорбция была ярко выраженной с количеством эритроцитов, прикрепленных к зараженной клетке, от 30 до 60. Средние значения титра вируса накопленного в трех различных партиях культуры ККМС были в пределах от 6,87 до 7,33 lg ГАДЕ 50/см³.

Для проверки чувствительности приготовленных партий культуры клеток КМС к вирусу АЧС заражали их в различных дозах вирулентным изолятом Богучары.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что все серии приготовленной культуры ККМС эффективно поддерживали репликацию вируса АЧС (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты проверки воздействия различных доз вируса АЧС на культуру клеток ККМС.

Партия ККМС Разведение вируса	Сутки от заражения культуры до появления гемадсорбции									
	10	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
От 10.04.2014	1	1	1	2	3	4	5-6	7	-	
От 28.04.2014	1	1	2	2	3	4	5	7	-	
От 07.05.2014	1	1	1	2	3	4	5	7-8	-	
От 13.05.2014	1	1	2	2	3	4	5	7-8	-	
От 20.05.2014	1	1	2	2	3	4	5-6	7	-	

Как видно, из результатов, приведенных в таблице 1, чувствительность и жизнеспособность приготовленных партий клеток КМС такова, что определение инфекционной активности вируса АЧС с титром 6,5 -7,0 lg ГАДЕ 50/см³, возможно провести в течение недели без дополнительного пересева проб конечного разведения вируса.

Таким образом, разработанные оптимальные приемы приготовления культуры клеток КМС позволили получать до 3 литров культуры с посадочной концентрацией 1-2 млн. клеток в 1см³. Экспериментальные образцы культуры клеток ККМС обладали высокой чувствительностью и репродуктивной эффективностью в отношении вируса АЧС.

Заключение.

1. Согласно ГОСТ 28573 – 90 «Свиньи. Методы лабораторной диагностики африканской чумы» в поддерживающую питательную среду добавляли 10% инактивированной нормальной свиной сыворотки. Это способствует улучшению регенерационной способности культуры

ККМС, и увеличивает количество прикрепленных клеток к поверхности культурального флакона. После адгезии клеток в культуральном флаконе на следующий день меняли питательную среду с более низким содержанием нормальной свиной сыворотки – всего 2%, что было достаточно для питания клеток.

В ходе экспериментов отмечено, что при использовании фетальной сыворотки КРС количество прикрепленных клеток заметно ниже, чем при использовании свиной сыворотки.

2. Для удаления из суспензии клеток механических и биологических (жир, осколки костей, соединительная ткань, и т.д.) примесей, проводили фильтрацию суспензии через 8-10 слоев стерильной марли. Для уменьшения потерь клеток при получении культуры ККМС применяли обработку клеточной суспензии раствором трипсина–версена (0,002%), что предотвращало образование клеточных конгломератов, которые оседали на марле при фильтрации. Наиболее эффективной являлась 3-4 кратная обработка трипсином – версеном при температуре 37°C.

3. Кроме того, установлено, что содержание механических и биологических примесей существенно снижается после трехкратного центрифугирования при 2000 об/мин в течение 20 минут.

Библиографический список:

1. Африканская чума свиней // Инфекционная патология животных: в 2 – х т. / гл. ред. А.Я. Самуйленко и др. // М. – 2006. – Т.1. – С. 807-817.
2. Бакулов И.А, Макаров В.В. Проблемы современной эволюции африканской чумы свиней // Вестник с/х науки. – 1990. - № 12. – С. 122-128.
3. Варенцова А.А., Ремыга С.Г., Гаврилова В.Л., Жуков И.Ю., Пузанкова О.С., Власова Н.Н., Шевцов А.А., Груздев К.Н. Сравнительный анализ свойств изолятов вируса африканской чумы свиней // Ветеринария. – 2013. - №12. – С. 27-32 .
4. ГОСТ 28573-90 Свиньи. Методы лабораторной диагностики африканской чумы. - Введ. 01.01.91 // М.: Стандартиформ. – 2005. – 11 с.
5. Макаров В.В. Африканская чума свиней // М.: Российский университет дружбы народов. – 2011. - 268 с.
6. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems / L.K. Dixon, C.C. Abrams, G. Bowick [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2004. – Vol. 100. – P. 117–134

7. Greig, A.S., Boulanger P., Bannister G.L. African swine fever virus. Cultivation of the virus in primary pig kidney cells // Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. – 1967. - Vol. 31. – P. 24-31.

8. Hess W.R. African swine fever virus // Virology monographs. – 1971. - Vol. 9. - P. 1-33.

9. OIE Terrestrial Manual. African swine fever. – 2012. - Section 2.8. - Chapter 2.8.1. - P. 3.

10. Malmquist W. A., Hay D. Haemadsorption and cytopathic effect produced by african swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures // Can. J. Comp. Med – 1960. - Vol. 36. - P. 309-316.

11. Sanchez Vizcaino, J. M., Becker Y. African swine fever diagnosis. In: African Swine Fever // Martinus Nijhoff, Boston, USA. – 1987. - P. 63-71.

12. Wardley, R.C., Wilrinson P. J., Hamilton F. African Swine Fever Virus Replication in Porcine Lymphocytes // J. Gen. Virol. – 1977. – Vol. 37, № 5. – P. 425 – 427.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS OF PORCINE BONE MARROW CELL CULTURE OBTAINING.

Zhukov I., Shevchenko I., Varentzova A., Biruchenkov D., Puzankova O., Vlasova N., Igolkin A.

Abstract: *The results of experiments on primary bone marrow cell culture obtaining for further inoculation by ASFV are presented. Presence of ASFV reproduction in primary cell culture was detected by appearance of haemadsorption phenomenon.*