

УДК 619:578.842.1.:57.082.26

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ И КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЕЙ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

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

Ключевые слова: *вирус африканской чумы свиней, культура клеток.*

Резюме: *Представлены результаты опытов по получению культур клеток (КК) альвеолярных макрофагов (АМС), костного мозга (КМС) и лейкоцитов свиней (ЛС) для дальнейшего заражения вирусом африканской чумы свиней (АЧС). Оптимизированы условия хранения, полученных культур АМС, КМС и ЛС при низких температурах от -65 до -70°C. Применяли диметилсульфоксид (ДМСО) в разных концентрациях, с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (КРС). Наилучшие результаты получены при использовании диметилсульфоксида в конечной концентрации 7-10%. Оптимальным сроком хранения АМС и ККМС в замороженном состоянии оказалось 6 месяцев. Указанный срок подтверждается и гемадсорбирующей активностью вируса АЧС в первичных культурах клеток.*

Введение. Африканская чума свиней – опасное вирусное заболевание свиней, характеризующееся явлениями острого токсикоза, геморрагическим диатезом и заканчивающееся почти всегда летальным исходом (3). Болезнь ранее регистрировали в Африке, Испании, Португалии, Франции, Бразилии и на Кубе (4).

Экономический ущерб для свиноводства при заносе и дальнейшем распространении АЧС значительный (7). Достоверная и своевременная постановка диагноза является основным звеном в мероприятиях по предотвращению дальнейшего распространения инфекции (6). Выделение и культивирование вируса АЧС удается на первичных культурах клеток лейкоцитов крови, костного мозга, альвеолярных макрофагов свиньи (3). Свежие клетки ЛС, АМС и КМС не всегда доступны, поэтому рационально иметь замороженные КК. Для этих целей применяют различные криопротекторы в т.ч. раствор по Вуду (глюкоза в растворах Эрла с добавлением ДМСО) (1, 2), а также диметилсульфоксид. Не отмечено значительной разницы при использовании указанных препаратов (8). Также не ясна эффективность внесения фетальной сыворотки, которая влияет на тургор клеток, и возможно позволит хранить КК достаточно длительный период времени. Поэтому оптимизация условий приготовления и замораживания КК ЛС, АМС и КМС является актуальной темой для усовершенствования методов лабораторных исследований.

Материалы и методы. В работе использовали поросят 1-3 месячного возраста живой массой 8-12 кг, полученных из хозяйств, благополучных по основным инфекционным заболеваниям. От животных отбирали материал для получения КК ЛС, АМС и КМС. При отмывании использовали среды Игла, ПСП с добавлением противомикробных средств широкого спектра действия, таких как бензилпенициллиновая калиевая/натриевая соль, стрептомицин, цефотаксим, метронидазол. При посеве на планшеты и матрасы, для ускорения прикрепления клеток культуры, в питательную среду добавляли 1% водные растворы солей кальция (CaCl_2 безводный) и магния ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Развитие нежелательной микрофлоры предупреждали добавлением этилового спирта ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) в различных концентрациях. Хранили полученные культуры АМС, КМС и КЛС при низких температурах ($t = -65\text{-}70^\circ\text{C} \pm 3$) с использованием ДМСО в разных концентрациях, а также добавляли сыворотку крови КРС. Подсчет клеток проводили с использованием стандартных прикладных методов (подсчет в камере Горяева), так и в автоматическом счетчике клеток CountessTM (InvitrogenTM, Корея). Первичные культуры клеток высевали в пластиковые 96-луночные планшеты, пластиковые флаконы объемом 25, 75 и 225 см³.

Для исследования гемадсорбции вируса АЧС готовили рабочую суспензию эритроцитов. Отбирали кровь у поросенка около 200 мл в стерильный флакон со стеклянными бусинами. Встряхивали в течение 30 минут на шуттель-аппарате. Фильтровали через воронку со

стерильной 4-х слойной марлей. Фильтрованные эритроциты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10-15 минут для отделения сыворотки. Отбирали сыворотку в отдельный флакон. Осадок эритроцитов трижды промывали физиологическим раствором (по 50 мл), центрифугировали 1000 об/мин в течение 10-15 минут. Оставшиеся в осадке эритроциты разводили физиологическим раствором 1:10 получали маточную суспензию. Добавляли 50 мкл/мл гентамицина и хранили 1 месяц при $t=+4^{\circ}\text{C}$. Из нее делали рабочую суспензию эритроцитов. Для чего брали 1 мл маточной суспензии и добавляли 9 мл физиологического раствора.

В данной работе культуры клеток заражали вирусом АЧС (изолят Кашино 04/13, заражающая доза 10^2 - 10^4 ГАД $_{50}$ /см 3).

Ход работы. Приготовление КК, начиная уже с этапа отбора исходного материала от животных, сопряжено с высокой вероятностью контаминирования биологического материала микробами и грибами, поэтому помимо использования противомикробных средств широкого спектра действия в ростовую питательную среду добавляли этиловый спирт. Результаты исследований представлены в таблице № 1.

Таблица 1 - Влияние этилового спирта на жизнеспособность первичных культур клеток

Наименование КК	Концентрация этилового спирта (C $_2$ H $_5$ OH), %					
	1	5	10	15	20	25
КМС	+	-	-	-	-	-
АМС	+	+	+	+	+	+
ЛС	+	+	+	+	+	+

+ - 100% сохранность клеток в течение 3-7дневного срока наблюдения.

- разрушение клеток

Из таблицы №1 следует, что самыми устойчивыми к содержанию в поддерживающей среде этилового спирта оказались клетки лейкоцитов свиней. Они сохраняли жизнеспособность при содержании в среде до 25% спирта в течение 3-7 дней (срок наблюдения) с сохранением полной стерильности. Клетки альвеолярных макрофагов свиней сохраняли жизнеспособность в течение 30 дней при максимальном содержании спирта от 10-15 до 25%. Клетки костного мозга свиней оказались наиболее чувствительными к действию этилового спирта. Концентрация этилового спирта свыше 1% оказывала разрушающее действие на

клетки КМС. При работе с вирусом АЧС было установлено, что клетки АМС, КМС и ЛС помещенные в среду, содержащую этиловый спирт, становятся малочувствительными к заражению. В связи с этим решено было применять разные противомикробные средства как отдельно, так и в сочетании друг с другом. Результаты представлены в таблице № 2.

Из таблицы № 2 видно, что при внесении в суспензию АМС одновременно несколько разных противомикробных и противогрибковых средств, макрофаги склеивались в конгломераты и в дальнейшем не прикреплялись ко дну сосуда культивирования. При внесении одного из лекарственных средств (гентамицина, бензилпенициллиновой калиевой/натриевой соли) суспензия оставалась прозрачной и клетки АМС прикреплялись ко дну сосуда культивирования, формируя монослой. А при внесении в суспензию таких лекарственных средств как амфотерицин, стрептомицин, цефотаксим содержимое матраца мутнело, адгезии АМС ко дну сосуда не происходило. В дальнейшем для предотвращения проростов пользовались гентамицином или бензилпенициллиновой калиевой/натриевой солями.

В качестве средства защиты клеток при их замораживании испытывали криопротектор ДМСО. Раствор диметилсульфоксида вносили в КК непосредственно перед замораживанием в различной конечной концентрации - 5, 7 и 10 %. Подсчет клеток проводили до и после замораживания. При использовании 5 % ДМСО, после размораживания первичных культур клеток, наблюдали, что крупных клеток почти нет, оболочка клеток не четкая, много клеточных осколков. При использовании 7-10 % ДМСО, напротив, получали крупные, блестящие клетки, детрит практически отсутствовал. Поэтому наиболее приемлемой концентрацией криопротектора оказался раствор с содержанием 7 – 10 % ДМСО.

Дальнейшие исследования касались продолжительности времени, при котором сохранность клеток в КК АМС и КМС была приемлемой для работы. Через 6, 7, 8 и 10 месяцев хранения биологический материал размораживали, подсчитывали жизнеспособные клетки, сеяли на планшеты и вели наблюдения за их ростом в течение 12 дней. Полученные данные свидетельствовали о том, что только клетки культур, хранившихся 6 месяцев, в отличие от остальных вышеперечисленных, оставались блестящими, крупными, с четко очерченной оболочкой. Через 7-8 месяцев хранения очертания практически всех клеток становились размытыми, а количество крупных клеток снижалось. Среди мелких клеток изменения были выражены не так ярко, но их концентрация неуклонно снижалась. По истечении 10 месяцев отмечали признаки дальнейшего снижения тургора, особенно у крупных клеток.

Таблица 2 - Воздействие противомикробных и противогрибковых средств на сохранность стерильности альвеолярных макрофагов свиней

Характеристика состояния АМС с добавлением	Результаты исследования через ... час	
	24	48
гентамицина	прозрачная культуральная среда	прозрачная культуральная среда
амфотерицина	помутнение культуральной среды	помутнение культуральной среды
метронидазола (трихопола)	помутнение культуральной среды	помутнение культуральной среды
бензилпенициллиновой калиевой/натриевой соли	прозрачная культуральная среда	прозрачная культуральная среда
стрептомицина	помутнение культуральной среды	помутнение культуральной среды
цефотаксима	помутнение культуральной среды	помутнение культуральной среды
гентамицина + бензилпенициллиновой калиевой/натриевой соли	без изменений	образование конгломератов клеток
гентамицина + бензилпенициллиновой калиевой/натриевой соли + амфотерицина	без изменений	образование конгломератов клеток
гентамицина + бензилпенициллиновой калиевой/натриевой соли + метронидазола (трихопола)	без изменений	образование конгломератов клеток

Значительно увеличивалась концентрация деформированных клеток и детрита, а количество мелких клеток становилось ниже. Таким образом, наиболее оптимальным временем хранения КК АМС и КМС является 6 месяцев.

Установлено, что на сохранность замороженных клеток влиял объем, в котором они подвергались заморозке. После размораживания клеток, хранившихся в объеме 3-5 мл, их сохранность составила 50%, а при оттаивании клеток, замороженных в объеме 2 мл число жизнеспособных клеток снижалось до 10%.

В серии опытов было определено, что концентрация клеток в различных культурах клеток после их хранения в замороженном состоянии отличалась. Результаты представлены в таблице № 3.

Таблица 3 - Сохранение клеток АМС и КМС, ЛС при глубоком замораживании

На- звание клеток	№/№ проб	ДМСО (%)	Сыворотка крови КРС (%)	Количество клеток (млн)		% вы- живших клеток
				до замора- живания	после размо- раживания	
КМС	1	7	100	21	2,8	13,3
	2	7	50	21	3,0	14,3
	3	7	100	50	15	30
АМС	1	7	43	20	8	40
	2	10	20	20	8	40
	3	7	15	20	7,8	39
ЛС	1	7	15	10	1,0	10
	2	7	15	20	10	50

Из данных таблицы №3 следует, что сохранность клеток в КК КМС составляла от 13,3 до 30%, сохранность клеток в КК АМС 39 - 40%, а в КК ЛС от 10 до 50%. Добавление сыворотки КРС в концентрации от 15 до 100% существенно не влияло на сохранность клеток.

Гемадсорбирующую активность вируса АЧС проверяли в зараженных им КК АМС и КМС, хранившихся в замороженном состоянии 6, 7, 8 и 10 месяцев. Для этого АМС, КМС вносили в пластиковые флаконы площадью 25 см² или в 96-луночные планшеты. Посевная концентрации клеток указана в таблице № 4.

Через 24 часа после посева культур клеток добавляли испытуемые пробы вируса АЧС. Далее вносили рабочую суспензию эритроцитов по 10 мкл в каждую лунку или по 100 мкл в культуральный флакон площадью 25 см². Через 3-4 дня флакон или планшет тщательно встряхивали и просматривали под световым микроскопом на наличие или отсутствие прикрепившихся эритроцитов на поверхность клеток АМС или КМС. Учет результатов производили в крестах. Не прикрепившиеся эритроциты плавали в культуральной среде. Прикрепившиеся эритроциты находятся на клетках. Если в поле зрения микроскопа наблюдали не менее 30–50 штук прикрепившихся эритроцитов к одной клетке, то результат оценивали на четыре креста (вокруг инфицированной клетки образует-

Таблица 4 - Посевная концентрация культур клеток АМС и КМС во флаконы и лунки планшетов

Характеристика пластиковой посуды	Посевная концентрация культур клеток	
	АМС	КМС
флаконы площадью 25 см ²	2,8 – 3,0 млн/см ²	2,0 - 4,0 млн/см ²
96-луночные планшеты	0,8 – 1,0 млн/см ²	2,0 - 4,0 млн/см ²

ся гроздь эритроцитов в виде ягоды «малины» - плотная гемадсорбция). Если 10-30 штук прикрепившихся эритроцитов – на три креста (скопленные эритроцитов в форме розетки – рыхлая гемадсорбция). Если 5-10 штук – два креста. Если 1-5 эритроцитов прикрепилось к клетке - один крест. Даже если только 1 прикрепившийся к клетке эритроцит виден в поле зрения микроскопа, то реакция считалась положительной, что свидетельствует о наличии вируса АЧС.

За реакцией наблюдали в течение 10 дней. Результаты представлены в таблице № 5.

Таблица 5 - Гемадсорбирующая активность вируса АЧС в культурах клеток АМС в зависимости от срока хранения

№/№ образцов	Месяцы хранения			
	6	7	8	10
1	++++	не исследовали	не исследовали	не исследовали
2	не исследовали	+++	не исследовали	не исследовали
3	не исследовали	не исследовали	+++	не исследовали
4	не исследовали	не исследовали	не исследовали	+++

При анализе таблицы № 5, отмечено, что после 7-10-месячного хранения гемадсорбирующая активность вируса АЧС снижалась в незначительной степени. Даже после 10 месяцев хранения гемадсорбирующая активность вируса АЧС учитывалась на 3 креста.

Выводы. Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать ряд выводов:

1. внесение в первичные культуры клеток на этапе их приготовления этилового спирта предотвращает рост и развитие нежелательной микрофлоры. Негативным следствием применения спирта является снижение чувствительности клеток вышеперечисленных культур к возбудителю АЧС.

2. Для предотвращения бактериальных, грибковых проростов КК наиболее эффективными явились гентамицин и бензилпенициллиновая калиевая/натриевая соль.

3. Оптимальной концентрацией диметилсульфоксида при использовании его в качестве криопротектора является 7-10%.

4. Внесение сыворотки крови КРС в высоких концентрациях значительного влияния на сохранность клеток при их хранении в замороженном состоянии не оказывает.

5. Оптимальным сроком криохранения КК АМС и КМС при $t = -65-70^{\circ}\text{C}$ является 6 месяцев.

6. Объем закладываемого на криохранение биологического материала в пробе должен составлять не менее 3-5 мл.

7. Высокий уровень гемадсорбирующей активности вируса АЧС в культуре клеток АМС отмечается не позднее 6-10 месяцев после хранения клеток в замороженном состоянии.

Библиографический список:

1. «Методические указания по выделению вирусов на альвеолярных макрофагах поросят». Глобенко Л.А., Камалова Н.Е., Жбанова Т.В., Пузанкова О.С., Мельников С. В. Владимир, ФГБУ ВНИИЗЖ, 1994, стр 1-11.

2. «Методические рекомендации по выделению вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) с использованием альвеолярных макрофагов свиней». Кукушкин С.А., Дудникова Н.С., Андреев В.Г., Каньшина А.В., Байбиков Т.З. г.Владимир, 2000, стр 1-8.

3. «Лабораторная диагностика вирусных болезней животных». Сюрин В.Н., Иванов Г.А., Краснобаева Е.А., Фомин Ю.В. – М, «Колос» 1972, стр.194 - 205.

4. Инфекционная патология животных А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Е.А.Непеклонов, Е.С. Воронин. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – с. 806-822.

5. Клинические признаки и патоморфологические изменения у домашних свиней при подостром течении африканской чумы свиней на территории РФ. Белянин С.А., Колбасов Д.В., Куриннов В.В., Рыжова Е.В., Пронин В.В., Корнева Г.В. Ветеринарная патология 2011, № 4 стр. 36-39.

6. Диагностика и дифференциальная диагностика африканской и классической чумы свиней. Вишняков И.Ф., Митин Н.И., Карпов Г.М., Куриннов В.В., Яшин А.Т. Ветеринария 1991, № 4 стр. 28-31.

7. Африканская чума свиней: обзор литературы. О.В. Кухаркина, И.А. Борисова, О.А. Борисова. Владимир: ФГБУ ВНИИЗЖ, 2012, стр. 19-31.

8. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. Carrascosa A.L., Santaren J.F., Vinuela E. J. Virol. Methods, 1982, Vol. 3, № 6, P. 303-310.

**OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR ALVEOLAR
MACROPHAGES AND BONE MARROW CELLS
STORAGE AT LOW TEMPERATURES.**

*Puzankova O., Zhukov I., Varentzova A., Shevchenko I.,
Biruchenkov D., Shevtzov A., Vlasova N., Gavrilova V., Igolkin A.*

Abstract: *The results of experiments on optimization of alveolar macrophages, bone marrow and porcine leukocytes cell cultures storage conditions at low temperatures for subsequent inoculation by ASFV are presented. Dimethyl sulfoxide in different concentrations with the addition of bovine serum was used for this purpose.*