

Исследование чувствительности изолята вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в перевиваемых линиях клеток

Е. В. Маркова¹, Л. С. Люлькова¹, Р. Н. Мельник¹, В. М. Попова¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, пос. Биокомбината, Россия

[✉]E-mail: biolog1967@mail.ru

Аннотация. В данной статье обобщены результаты исследования культуральных свойств изолята вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в перевиваемых культурах клеток МА-104, РК-15, MARC-145 и Vero. **Целью** исследований было определение чувствительности к изоляту вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней линий культур клеток, что необходимо для получения высокоактивного антигена как главного компонента диагностических и вакцинных биопрепаратов. Изолят вируса был выделен от поросенка в ЛПХ Московской области Коломенского района. Выделенный изолят инфекционного заболевания свиней методом молекулярно-биологического анализа охарактеризован в установленном для данного возбудителя порядке. **Новизна. Продемонстрирована возможность репродукции вируса в культуре клеток MARC-145. Результаты.** Показано, что при репродукции изолята вируса в культуре клеток в течение 96 ± 6 часов при дозе заражения $0,1 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$ получали антиген с высокой биологической активностью. Инфекционная активность вируса на культуре MARC-145 составляла в среднем после трех первых пассажей (после адаптации) $5,51 \pm 0,45 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Методом ПЦР в реальном времени подтверждено присутствие генома вируса в исследуемых пробах. Обнаружение антигена в инфицированной вирусом культуре клеток определяли по проявлению специфического свечения в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) в монослое культуры клеток, фиксированной ацетоном. Установлено, что ФИТЦ-конъюгат кроличьих поликлональных антител к иммуноглобулинам свиньи выявлял антигенсодержащие клетки зеленоватым интенсивным свечением.

Ключевые слова: репродуктивно-респираторный синдром свиней, культура клеток, репродукция вируса.

Для цитирования: Маркова Е. В., Люлькова Л. С., Мельник Р. Н., Попова В. М. Исследование чувствительности изолята вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в перевиваемых линиях клеток // Аграрный вестник Урала. 2020. № 04 (195). С. ... DOI: ...

Дата поступления статьи: 20.03.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС, «голубой аборт», «синее ухо») – высококонтагиозное заболевание, которое наносит значительный экономический урон свиноводству многих стран. Заболевание характеризуется респираторными нарушениями, цианозом кожи ушей и других органов, поздними абортами и мертворождением. Впервые заболевание наблюдалось в США и Канаде в 1986 году, затем оно быстро распространилось в Европу с развитым свиноводством. В 1991 году на первичной культуре клеток свиней был выделен возбудитель вируса [3]. Возбудителем РРСС является РНК-содержащий вирус размером 45–65 нм, имеющий наружную оболочку и чувствительный к липидным растворителям. Возбудитель РРСС относится к семейству Arteriviridae, роду Arterivirus, для него характерна антигенная вариабельность. Каждый год в разных странах мира выделяют новые изоляты вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Изоляты делят на 2 типа по антигенным и генетическим различиям: европейский (Lelystad) и американский (VR-2332). Несмотря на это,

до сих пор существуют трудности при выделении вируса и его адаптации в течение длительного культивирования к первичным и перевиваемым культурам клеток. Вирус РРСС успешно репродуцируется в легочных альвеолярных макрофагах (АМФ) поросят. МА-104 и MARC-145 (клонный вариант, полученный из перевиваемой культуры клеток почки африканской зеленой мартышки) являются чувствительными к репродуктивно-респираторному синдрому свиней.

Методология и методы исследования (Methods)

Целью наших исследований было определение чувствительности к изоляту вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней линий культур клеток, что необходимо для получения высокоактивного антигена как главного компонента диагностических и вакцинных биопрепаратов.

Изолят вируса был выделен в ФГБНУ ВНИТИБП от большого поросенка из ЛПХ Московской области Коломенского района на первичной культуре клеток альвеолярных макрофагов свиней (АМС) и подтвержден результатами ПЦР. Изолят вируса репродуктивно-респираторного

синдрома свиней методом ПЦР был охарактеризован как европейский – генотип 1. Культуральные свойства изолята изучали на перевиваемых линиях культур клеток МА-104, MARC-145 (клон культуры МА-104, полученный из почки мартышки), PK-15 и Vero. Культуры клеток заражали по 0,001–1,0 ТЦД₅₀/кл. вирусосодержащим материалом и инкубировали при температуре (37,0 ± 0,5) °С в течение 3–9 суток, оценивая состояние монослоя. Для репродукции вируса и культивирования клеток применяли среду ДМЕМ с содержанием 5–10-процентной фетальной сыворотки крупного рогатого скота. ДМЕМ получали в готовом для использования виде из ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург) и из ООО «ПанЭко» (Москва). Сухой компонент ДМЕМ для приготовления питательной среды по инструкции производителя заказывали в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск). Методом ПЦР в реальном времени подтверждали присутствие генома вируса в исследуемых пробах. Обнаружение антигена вируса в зараженной культуре клеток определяли по проявлению специфического свечения в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) в монослое культуры клеток, фиксированной ацетоном. Результаты исследований учитывали с помощью цифровой цветной камеры CMOS 5 Мпикс, адаптера 0,35 C-mount для микроскопа Olympus с подключением компьютера с портом USB 3.0. Биологическую активность полученных материалов определяли путем

титрования, титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в lg ТЦД₅₀/см³ [1]. Изолят вируса в культурах клеток культивировали в течение трех последовательных пассажей с последующим определением биологической активности полученных вирусосодержащих материалов в культуре клеток.

Результаты (Results)

Проведенные комплексные исследования, **включающие вирусологические, молекулярно-генетические методы, подтвердили** принадлежность выделенного изолята к репродуктивно респираторному синдрому свиней европейского типа. Выделенный изолят обладал типичными для данного вируса культуральными свойствами и имел высокую степень идентичности к генетической линии репродуктивно-респираторного синдрома свиней, относящегося к европейскому генотипу. В результате проведенных исследований получены следующие данные, которые в сокращенном виде приведены в таблице 1 и представлены на рисунке.

Инфекционная активность вируса составляла в среднем 5,5 ± 0,5 lg ТЦД₅₀/см³. В процессе пассирования отмечали постепенное накопление вируса. Данные свидетельствуют о том, что титр вируса в культуре клеток MARC-145 находился на достаточно высоком уровне, увеличился к пятому пассажу на 0,47 ± 0,01 логарифма и составил 5,12 ± 0,04 lg ТЦД₅₀/см³. Также провели опыты по определению множественности заражения и времени культиви-

Таблица 1
Результаты исследования активности вирусосодержащего материала

Наименование	Номер пассажа вируса	Период репродукции вируса, часы	ПЦР: Ct ≤ 40 – положительный результат, Ct > 40 – отрицательный результат	Инфекционная активность вируса, ТЦД ₅₀ /см ³
PK-15	1	4	Ct = 23,68	5,05 ± 0,21
	2		Ct = 23,88	5,01 ± 0,13
	3		Ct = 23,94	4,97 ± 0,12
МА-104	1	4	Ct = 22,58	5,25 ± 0,22
	2		Ct = 19,92	5,33 ± 0,25
	3		Ct = 13,29	5,22 ± 0,24
MARC-145	1	4	Ct = 16,75	5,69 ± 0,21
	2		Ct = 23,10	5,13 ± 0,19
	3		Ct = 18,09	5,22 ± 0,15
Vero	1	4	Ct = 14,86	4,61 ± 0,15
	2		Ct = 20,17	4,57 ± 0,17
	3		Ct = 17,03	4,39 ± 0,14

Table 1
The results of the study of the biological activity of virus-containing material

Name	Virus passage number	Virus reproduction period, hours	PCR: Ct ≤ 40 – positive, Ct > 40 – negative	Infectious activity of the virus, TCD ₅₀ /cm ³
PK-15	1	4	Ct = 23.68	5.05 ± 0.21
	2		Ct = 23.88	5.01 ± 0.13
	3		Ct = 23.94	4.97 ± 0.12
MA-104	1	4	Ct = 22.58	5.25 ± 0.22
	2		Ct = 19.92	5.33 ± 0.25
	3		Ct = 13.29	5.22 ± 0.24
MARC-145	1	4	Ct = 16.75	5.69 ± 0.21
	2		Ct = 23.10	5.13 ± 0.19
	3		Ct = 18.09	5.22 ± 0.15
Vero	1	4	Ct = 14.86	4.61 ± 0.15
	2		Ct = 20.17	4.57 ± 0.17
	3		Ct = 17.03	4.39 ± 0.14

Таблица 2
Скорость формирования и качество монослоя
в зависимости от посевной концентрации клеток
MARC-145 при использовании ДМЕМ ООО
«БиолоТ», $n = 4$

Концентрация клеток, тыс. в см ³	Формирование монослоя, часы	Визуальная оценка качества монослоя
70 ± 10	100 ± 2	Неудовлетворительно
100 ± 10	91 ± 1	Неудовлетворительно
150 ± 10	72 ± 0,5	Удовлетворительно
200 ± 10	37 ± 0,3	Хорошо
250 ± 10	27 ± 0,8	Плотный монослой
300 ± 10	25 ± 0,7	Плотный монослой с небольшим вытеснением клеток и ростом на поверхности
350 ± 10	22 ± 0,9	Плотный монослой с вытеснением клеток и ростом на поверхности
400 ± 10	20 ± 0,4	Плотный монослой с вытеснением клеток и ростом на поверхности

Table 2
The rate of formation and quality
of the monolayer depending on the inoculum
concentration of MARC-145 cells when using DMEM
"BioloT", $n = 4$

The concentration of cells, thousand in cm ³	Monolayer formation, hours	Visual assessment of monolayer quality
70 ± 10	100 ± 2	Unsatisfactorily
100 ± 10	91 ± 1	Unsatisfactorily
150 ± 10	72 ± 0.5	Satisfactorily
200 ± 10	37 ± 0.3	Good
250 ± 10	27 ± 0.8	Dense monolayer
300 ± 10	25 ± 0.7	Dense monolayer with the small displacement of cells up and their growth on the surface of the monolayer
350 ± 10	22 ± 0.9	Dense monolayer with the displacement of cells up and their growth on the surface of the monolayer
400 ± 10	20 ± 0.4	Dense monolayer with the displacement of cells up and their growth on the surface of the monolayer

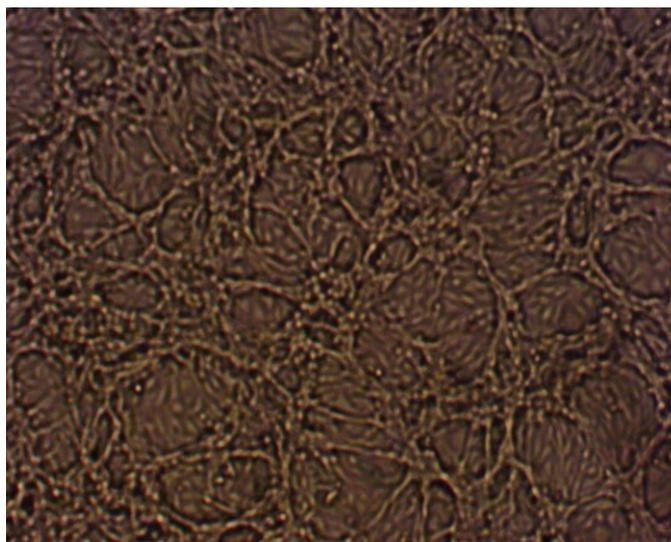
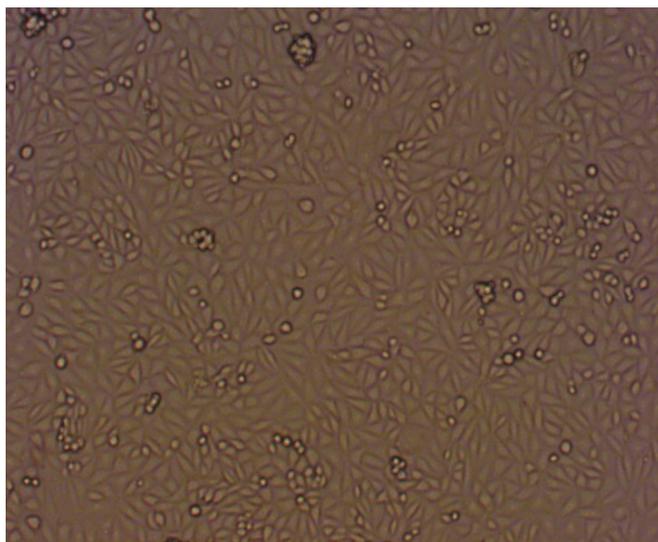


Рис. Культура клеток MARC-145 неинфицированная (контрольная) и инфицированная вирусом PRRSV.
Увеличение 1×20, камера с монитором HDM

Fig. Cell culture MARC-145 uninfected (control) and infected with swine reproductive and respiratory syndrome virus.
Magnification 1×20, the camera monitor with HDM

рования вируса. Использовали дозы заражения 0,01; 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/кл. Результаты показали, что при использовании дозы заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл отмечали наиболее высокое накопление вируса. С увеличением срока культивирования его инфекционная активность повышалась и достигала максимума к 96 часам, титр вируса составил 5,04 ± 0,14 lg ТЦД₅₀/см³ при множественности заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл, в то время как при множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл титр вируса к 96 часам составил 4,57 ± 0,16 lg ТЦД₅₀/см³, а при 1,0 ТЦД₅₀/кл – 4,68 ± 0,14 lg ТЦД₅₀/см³. Инфекционная активность вируса на культуре MARC-145 составляла в среднем после трех первых пассажей (после адаптации) 5,51 ± 0,45 lg ТЦД₅₀/см³.

С целью предоставления изоляту вируса наилучших условий для репродукции все культуры клеток, участву-

ющие в настоящем исследовании, адаптировали к питательным средам, сывороткам, глутамину, промывочным и диспергирующим растворам и т. п. В процессе исследования чувствительности изолята вируса к перевиваемым линиям клеток было установлено, что питательные среды разных производителей оказывали значительное влияние на количество посевной концентрации клеток и качество полученного монослоя. Суспензию клеток MA-104, PK-15, MARC-145 и Vero с концентрацией от 70 до 400 тыс. в см³ вносили в разные культуральные сосуды. Качество монослоя оценивали через каждые 2 часа после посева в течение рабочего дня. При испытании влияния ростовых питательных сред ДМЕМ разных изготовителей на скорость и качество формирования монослоя клеток MARC-145 в данные среды добавляли 7–10 % сыворотки крови

Таблица 3

Скорость формирования и качество монослоя в зависимости от посевной концентрации клеток MARC-145 при использовании ДМЕМ ООО «ПанЭко», $n = 4$

Концентрация клеток, тыс. в cm^3	Формирование монослоя, часы	Визуальная оценка качества монослоя
70 ± 10	$100 \pm 4,0$	Неудовлетворительно
100 ± 10	$91 \pm 2,0$	Неудовлетворительно
150 ± 10	$82 \pm 3,0$	Удовлетворительно
200 ± 10	$37 \pm 3,1$	Удовлетворительно
250 ± 10	$29 \pm 2,12$	Хорошо
300 ± 10	$25 \pm 0,6$	Хорошо
350 ± 10	$28 \pm 1,1$	Плотный монослой
400 ± 10	$26 \pm 1,3$	Плотный монослой с вытеснением клеток и ростом на поверхности

Table 3

The rate of formation and quality of the monolayer depending on the seeding concentration of MARC-145 cells when using DMEM "PanEco", $n = 4$

The concentration of cells, thousand in cm^3	Monolayer formation, hours	Visual assessment of monolayer quality
70 ± 10	100 ± 4.0	Unsatisfactorily
100 ± 10	91 ± 2.0	Unsatisfactorily
150 ± 10	82 ± 3.0	Satisfactorily
200 ± 10	37 ± 3.1	Satisfactorily
250 ± 10	29 ± 2.12	Good
300 ± 10	25 ± 0.6	Good
350 ± 10	28 ± 1.1	Dense monolayer
400 ± 10	26 ± 1.3	Dense monolayer

Таблица 4

Скорость формирования и качество монослоя в зависимости от посевной концентрации клеток MARC-145 при использовании ДМЕМ ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор», $n = 14$

Концентрация клеток, тыс. в cm^3	Формирование монослоя, часы	Визуальная оценка качества монослоя
70 ± 10	$95 \pm 7,1$	Неудовлетворительно
100 ± 10	$79 \pm 2,0$	Удовлетворительно
150 ± 10	$66 \pm 2,3$	Хорошо
200 ± 10	$34 \pm 1,0$	Хорошо
250 ± 10	$29 \pm 3,1$	Плотный монослой
300 ± 10	$26 \pm 2,0$	Плотный монослой с небольшим вытеснением клеток и ростом на поверхности
350 ± 10	$20 \pm 0,51$	Плотный монослой с вытеснением клеток и ростом на поверхности
400 ± 10	$18 \pm 1,2$	Плотный монослой с вытеснением клеток и ростом на поверхности

Table 4

The rate of formation and quality of the monolayer depending on the seeding concentration of MARC-145 cells when using DMEM State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", $n = 14$

The concentration of cells, thousand in cm^3	Monolayer formation, hours	Visual assessment of monolayer quality
70 ± 10	95 ± 7.1	Unsatisfactorily
100 ± 10	79 ± 2.0	Satisfactorily
150 ± 10	66 ± 2.3	Good
200 ± 10	34 ± 1.0	Good
250 ± 10	29 ± 3.1	Dense monolayer
300 ± 10	26 ± 2.0	Dense monolayer with slight cell elongation and surface growth
350 ± 10	20 ± 0.51	Dense monolayer with the displacement of cells up and their growth on the surface of the monolayer
400 ± 10	18 ± 1.2	Dense monolayer with the displacement of cells up and their growth on the surface of the monolayer

крупного рогатого скота, 0,5–0,7 мг/см³ глутамина. Результаты исследований по оценке оптимальной посевной концентрации клеток на примере культуры MARC-145 при использовании питательных сред разных производителей представлены в таблицах 2–4.

Удовлетворительный культуры клеток MARC-145 на ДМЕМ ООО «БиолоТ» получали через 72 ± 0,5 часа при посевной концентрации 150 ± 10 тыс. кл/см³. При посевах более низкой посевной концентрации клеток монослой формировался значительно позднее. Применение при посевной концентрации более 250 тыс. клеток в см³ приводило к формированию плотного монослоя с вытеснением клеток и их росту на поверхности монослоя. Удовлетворительный монослой культуры клеток MARC-145 на ДМЕМ ООО «ПанЭко» получали через 37 ± 3,1 часа при посевной концентрации не менее 200 ± 10 тыс. кл/см³. При использовании питательной среды ДМЕМ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» удовлетворительный результат формирования монослоя получали через 79 ± 2,0 часа после начала культивирования при посевной концентрации 100 тыс. клеток в см³.

При использовании питательной среды ДМЕМ производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» при репродукции вируса сформировавшийся монослой всех типов культур клеток, используемых в экспериментах, был всегда плотный и ровный. Питательные среды ДМЕМ других производителей могли приводить к образованию изолированных зон роста клеток, которые не всегда смыкались в сплошной монослой даже через 72 часа после высева клеток в культуральные сосуды. Поэтому во всех дальнейших исследованиях по изучению изолятов вируса, в том числе и с целью получения диагностических и вакцинных препаратов было принято решение использовать только питательные среды, поставленные из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Так как изолят вируса оказался генетически стабильным, то он может быть рекомендован для изготовления диагностических и вакцинных препаратов. Этот изолят оказался продуктивным в культурах клеток MA-104 и Marc-145, прошел 15 пассажей, что имеет преимущество для репродукции вируса и получения антигена с целью дальнейшего изучения его молекулярно-генетических свойств.

Библиографический список

1. Богомоллова О. А., Матвеева И. Н., Попова В. М. Чувствительность перевиваемых линий культур клеток MARC-145 и MA-104 к изоляту вируса цирковирусной инфекции свиней // Научный альманах. 2018. № 5.2 (43). С. 166–169. DOI: 10.17117/na.2018.05.02.166.
2. Глотов А. Г., Котенева С. В., Глотова Т. И., Южаков А. Г., Максютков Р. А., Забережный А. Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири // Вопросы вирусологии. 2018. Т. 63. № 4. С. 185–191.
3. Гулюкин А. М., Шабейкин А. А., Макаров В. В., Зайкова О. Н., Гребенникова Т. В., Забережный А. Д., Полякова И. В., Южаков А. Г. Особенности эпизоотологического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области // Вопросы вирусологии. 2018. Т. 63. № 3. С. 115–122.
4. Есимбекова Н. Б., Тулемисова Ж. К. Чувствительность перевиваемых линий культур клеток к изоляту вируса цирковирусной инфекции свиней // Научный взгляд молодых: поиски, инновации в АПК: сборник материалов международной научно-практической конференции молодых ученых. Алматы, 2017. Т. 2. С. 41–42.
5. Забережный А. Д., Костина Л. В., Южаков А. Г., Гулюкина И. А., Степанова Т. В., Стаффорд В. В., Полякова И. В., Дроздова Е. И. Современная таксономия вирусов // Ветеринария и кормление. 2017. № 1. С. 4–13.
6. Забережный А. Д., Искандаров М. И., Гулюкин А. М., Федоров А. И., Искандарова С. С., Винокуров Н. Т. Каталогизация генотипов штаммов из коллекции патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней животных // Иппология и ветеринария. 2019. № 3 (33). С. 105–111.
7. Попова В. М., Матвеева И. Н., Иванов И. В., Маркова Е. В., Преображенская А. С., Богомоллова О. А. Изучение репродукции цирковируса свиней 2 типа в перевиваемой культуре клеток MARC-145 // Труды ВИЭВ. 2018. Т. 80. Ч. II. С. 68–72. DOI: 10.30917//ATT-PRINT-2018-4.
8. Стаффорд В. В., Забережный А. Д., Гулюкин М. И. Патоморфологические изменения паренхиматозных органов поросят, экспериментально зараженных вирусом репродуктивно-респираторного синдрома свиней и цирковирусом свиней типа 2 // Ветеринария. 2016. № 9. С. 24–27.
9. Стаффорд В. В., Раев С. А., Алексеев К. П., Южаков А. Г., Алипер Т. И., Забережный А. Д., Гулюкин М. И., Верховский О. А. Иммуногистохимический метод выявления вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней // Ветеринария. 2017. № 2. С. 26–30.
10. Стаффорд В. В., Стрельцова Я. Б., Раев С. А., Южаков А. Г., Забережный А. Д., Алипер Т. И., Использование метода иммуногистохимии при диагностике цирковирусных болезней свиней // Ветеринария. 2019. № 8. С. 18–22.
11. Стаффорд В. В., Корицкая М. А., Раев С. А., Алексеев К. П., Цибезов В. В., Верховский О. А., Алипер Т. И., Забережный А. Д., Гулюкин М. И. Научно-обоснованная система противозооотических мероприятий и современные способы диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Новосибирск, 2019. DOI: 10.13140/RG.2.2.22203.77607/1.
12. Южаков А. Г., Раев С. А., Непоклонов Е. А., Забережный А. Д., Алексеев К. П. Актуальные инфекционные болезни свиней / Под ред. Т. И. Алипера. М. : Издательство «Зооветкнига», 2019. 395 с.
13. Bai W., Wang Z., Sun P., Zhang J., Bao H., Cao Y., Chang Y., Liu Z., Li D., Lu Z. The molecular characteristic analysis of PRRSV GSWW/2015 strain and its pathogenicity to pigs // BMC Vet. Res. 2018. No. 14 (1). P. 240.
14. Feehan B. J., Penin A. A., Mukhin A. N., Kumar D., Moskvina A. S., Khametova K. M., Yuzhakov A. G., Musienko M. I., Zaberezhny A. D., Aliper T. I., Marthaler D., Alekseev K. P., Novel Mammalian orthorubalovirus 5 discovered as accidental cell culture contaminant // Viruses. 2019. T. 11. No. 9. P. 777.

15. Raev S. A., Yuzhakov A. G., Alekseev K. P., Kostina L. V., Gulyukin M. I., Stepanova T. V., Zaberezhniy A. D., Aliper T. I. Transmission of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in Russia and Genotype association (PCV2D) with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS) // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2019. P. 042026.
16. Yuzhakov A. G., Raev S. A., Alekseev K. P., Grebennikova T. V., Verkhovsky O. A., Zaberezhny A. D., Aliper T. I. First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia // Virus Genes. 2018. No. 54 (4). Pp. 608–611.
17. Yuzhakov A. G., Raev S. A., Skrylev A. N., Mishin A. M., Grebennikova T. V., Verkhovsky O. A., Zaberezhny A. D., Trus I., Nauwynck H. J., Aliper T. I. Genetic and pathogenic characterization of a Russian subtype 2 PRRSV-1 isolate // Vet. Microbiol. 2017. No. 211. Pp. 22–28.

Об авторах:

Евгения Владимировна Маркова¹, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной биологии и вирусологии, ORCID 0000-0002-6167-6405, AuthorID 1060291; +7 (496) 567-32-63; biolog1967@mail.ru

Лариса Сергеевна Люлькова¹, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств, ORCID 0000-0003-3433-5930, AuthorID 372470

Роман Николаевич Мельник¹, кандидат биологических наук, заместитель директора, ORCID 0000-0003-1531-2050, AuthorID 902465

Вера Михайловна Попова¹, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной биологии и вирусологии, ORCID 0000-0003-0833-8415, AuthorID 413263

¹ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, пос. Биокombината, Россия

Cultural properties of swine reproductive and respiratory syndrome virus isolate

E. V. Markova[✉], L. S. Lyulkova¹, R. N. Melnik¹, V. M. Popova¹

¹ All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Biokombinata, Russia

[✉]E-mail: biolog1967@mail.ru

Abstract. This article summarizes the results of a study of the cultural properties of the swine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in transferable cultures of MA-104, PK-15, MARC-145 and Vero cells. The **purpose** of our research was to determine the sensitivity of cell culture lines to the swine reproductive and respiratory syndrome virus isolate, which is necessary for obtaining a highly active antigen as the main component of diagnostic and vaccine biologics. An isolate of the virus was isolated from a Piglet in the LPH of the Moscow region of the Kolomenskoye district. The isolated isolate of an infectious disease of pigs by the method of molecular biological analysis is characterized in the established order for this pathogen. **Novelty.** The possibility of reproduction in MARC-145 cell culture has been demonstrated. **Results.** It was shown that during reproduction of the virus isolate in cell culture for 96 ± 6 hours at a dose of 0.1 TCD₅₀/cell infection, an antigen with high biological activity was obtained. Infectious activity of the virus on the MARC-145 culture averaged 5.51 ± 0.45 lg TCD₅₀/cm³ after the first three passages (after adaptation). Real-time PCR confirmed the presence of the virus genome in the test samples. Detection of the virus antigen in an infected cell culture was determined by the manifestation of a specific glow in the indirect immunofluorescence (RNIF) reaction in the cell culture monolayer fixed with acetone. It was found that FITZ-conjugate of rabbit polyclonal antibodies to pig immunoglobulins detected antigen-containing cells due to intense illumination.

Keywords: pig reproductive and respiratory syndrome, cell culture, virus reproduction.

For citation: Markova E. V., Lyulkova L. S., Melnik R. N., Popova V. M. Issledovanie chuvstvitel'nosti izolyata virusa reproductivno-respiratornogo sindroma sviney v perevivaemykh liniyakh kletok [Cultural properties of swine reproductive and respiratory syndrome virus isolate] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 04 (195). Pp. ... DOI: ... (In Russian.)

Paper submitted: 20.03.2020.

References

1. Bogomolova O. A., Matveeva I. N., Popova V. M. Chuvstvitel'nost' perevivaemykh liniy kul'tur kletok MARC-145 i MA-104 k izolyatu virusa tsirkovirusnoy infektsii sviney [Sensitivity of cross-linked lines of MARC-145 and MA-104 cell cultures to swine circovirus infection virus isolate] // Nauchnyy al'manakh. 2018. No. 5-2 (43). Pp. 166–169. DOI: 10.17117/na.2018.05.02.166 (In Russian.)
2. Glotov A. G., Koteneva S. V., Glotova T. I., Yuzhakov A. G., Maksyutov R. A., Zaberezhnyy A. D., Filogeneticheskiy analiz pestivirusov krupnogo rogatogo skota, vyyavlennykh v Sibiri [Phylogenetic analysis of Bovine pestiviruses detected in Siberia] // Problems of virology. 2018. T. 63. No. 4. Pp. 185–191 (In Russian.)

3. Gulyukin A. M., Shabaykin A. A., Makarov V. V., Zaykova O. N., Grebennikova T. V., Zaberezhnyy A. D., Polyakova I. V., Yuzhakov A. G., Osobennosti epizootologicheskogo protsessa i molekulyarno-geneticheskaya kharakteristika izolyatov virusa beshenstva, vyyavlenykh na territorii Tverskoy oblasti [Features of the epizootological process and molecular genetic characteristics of virus isolates of rabies in Tver region] // Problems of virology. 2018. T. 63. No. 3. Pp. 115–122 (In Russian.)

4. Esimbekova N. B., Tulemisova Zh. K. Chuvstvitel'nost' perevivaemykh liniy kul'tur kletok k izolyatu virusa tsirkovirusnoy infektsii sviney [The sensitivity of transplanted cell culture lines to the isolate of swine circovirus infection virus] // Nauchnyy vzglyad molodykh: poiski, innovatsii v APK: sbornik materialov mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh. Almaty, 2017. T. 2. Pp. 41–42 (In Russian.)

5. Zaberezhnyy A. D., Kostina L. V., Yuzhakov A. G., Gulyukina I. A., Stepanova T. V., Stafford V. V., Polyakova I. V., Drozdova E. I., Sovremennaya taksonomiya virusov [Modern taxonomy of viruses] // Veterinaria i kormlenie. 2017. No. 1. Pp. 4–13 (In Russian.)

6. Zaberezhnyy A. D., Iskandarov M. I., Gulyukin A. M., Fedorov A. I., Iskandarova S. S., Vinokurov N. T., Katalogizatsiya genotipov shtammov iz kolleksii patogennykh i vaksinnnykh shtammov mikroorganizmov – vozбудiteley infektsionnykh bolezney zhivotnykh [Cataloging the genotypes from a collection of pathogenic and vaccine strains of microorganisms-causative agents of infectious animal diseases] // Hippology and veterinary. 2019. No. 3 (33). Pp. 105–111 (In Russian.)

7. Popova V. M., Matveeva I. N., Ivanov I. V., Markova E. V., Preobrazhenskaya A. S., Bogomolova O. A. Izuchenie reproduktivnoy tsirkovirusa sviney 2 tipa v perevivaemoy kul'ture kletok MARC-145 [Study of reproduction of porcine circovirus type 2 in transferable cell culture MARC-145] // Trudy VIEV. 2018. T. 80. Part II. Pp. 68–72. DOI:10.30917//ATT-PRINT-2018-4 (In Russian.)

8. Stafford V. V., Zaberezhnyy A. D., Gulyukin M. I., Patomorfologicheskie izmeneniya parenkhimatoznykh organov porosyat, eksperimental'no zarazhennykh virusom reproduktivno-respiratornogo sindroma sviney i tsirkovirusom sviney tipa 2 [Pathomorphological changes parenchymal organs of piglets experimentally infected by RRSSV and PCV-2] // Veterinary. 2016. No. 9. Pp. 24–27. (In Russian.)

9. Stafford V. V., Raev S. A., Alekseev K. P., Yuzhakov A. G., Aliper T. I., Zaberezhnyy A. D., Gulyukin M. I., Verkhovskiy O. A. Immunogistokhimicheskiy metod vyyavleniya virusa reproduktivno-respiratornogo sindroma sviney [Immunohistochemical method for the detection of pig reproductive and respiratory syndrome virus] // Veterinary. 2017. No. 2. Pp. 26–30 (In Russian.)

10. Stafford V. V., Strel'tsova Ya. B., Raev S. A., Yuzhakov A. G., Zaberezhnyy A. D., Aliper T. I., Ispol'zovanie metoda immunogistokhimii pri diagnostike tsirkovirusnykh bolezney sviney [Application of immunohistochemistry method in diagnosis of porcine circovirus associated diseases] // Veterinary. 2019. No. 8. Pp. 18–22 (In Russian.)

11. Stafford V. V., Koritskaya M. A., Raev S. A., Alekseev K. P., Tsibezov V. V., Verkhovskiy O. A., Aliper T. I., Zaberezhnyy A. D., Gulyukin M. I., Nauchno-obosnovannaya sistema protivoepizooticheskikh meropriyatii i sovremennyye sposoby diagnostiki, spetsificheskoy profilaktiki i lecheniya infektsionnykh bolezney sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh [Scientifically-based system of antiepidemiological measures and modern methods of diagnosis, specific prevention and treatment of infectious diseases of farm animals]. Novosibirsk, 2019. DOI: 10.13140/RG.2.2.22203.77607/1 (In Russian.)

12. Yuzhakov A. G., Raev S. A., Nepoklonov E. A., Zaberezhnyy A. D., Alekseev K. P., Aktual'nye infektsionnye bolezni sviney [Topical infectious diseases of pigs] / Under the editorship of T. I. Aliper. Moscow : Izdatel'stvo "Zoovetkniga", 2019. 395 p. (In Russian.)

13. Bai W., Wang Z., Sun P., Zhang J., Bao H., Cao Y., Chang Y., Liu Z., Li D., Lu Z. The molecular characteristic analysis of PRRSV GSWV/2015 strain and its pathogenicity to pigs // BMC Vet. Res. 2018. No. 14 (1). P. 240.

14. Feehan B. J., Penin A. A., Mukhin A. N., Kumar D., Moskvina A. S., Khametova K. M., Yuzhakov A. G., Musienko M. I., Zaberezhnyy A. D., Aliper T. I., Marthaler D., Alekseev K. P., Novel Mammalian orthorubalovirus 5 discovered as accidental cell culture contaminant // Viruses. 2019. T. 11. No. 9. P. 777.

15. Raev S. A., Yuzhakov A. G., Alekseev K. P., Kostina L. V., Gulyukin M. I., Stepanova T. V., Zaberezhnyy A. D., Aliper T. I. Transmission of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in Russia and Genotype association (PCV2D) with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS) // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2019. P. 042026.

16. Yuzhakov A. G., Raev S. A., Alekseev K. P., Grebennikova T. V., Verkhovskiy O. A., Zaberezhnyy A. D., Aliper T. I. First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia // Virus Genes. 2018. No. 54 (4). Pp. 608–611.

17. Yuzhakov A. G., Raev S. A., Skrylev A. N., Mishin A. M., Grebennikova T. V., Verkhovskiy O. A., Zaberezhnyy A. D., Trus I., Nauwynck H. J., Aliper T. I. Genetic and pathogenic characterization of a Russian subtype 2 PRRSV-1 isolate // Vet. Microbiol. 2017. No. 211. Pp. 22–28.

Authors' information:

Evgeniya V. Markova¹, candidate of agricultural sciences, senior researcher of the department of molecular biology and virology, ORCID 0000-0002-6167-6405, AuthorID 1060291; +7 (496) 567-32-63; biolog1967@mail.ru

Larisa S. Lyulkova¹, doctor of biology, leading researcher of the department of quality assurance of medicines, ORCID 0000-0003-3433-5930, AuthorID 372470

Roman N. Melnik¹, candidate of biological sciences, deputy director, ORCID 0000-0003-1531-2050, AuthorID 902465

Vera M. Popova¹, doctor of biological sciences, leading researcher of the department of molecular biology and virology, ORCID 0000-0003-0833-8415, AuthorID 413263

¹ All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Biokombinata, Russia