



Определение репродуктивных свойств вируса классической чумы свиней вирулентных и вакцинных штаммов в первичных и перевиваемых культурах клеток

И. С. Колбин¹, А. С. Иголкин², В. Л. Гаврилова³, О. С. Пузанкова⁴, Е. В. Аронова⁵, А. А. Елсукова⁶, Н. Н. Власова⁷

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>, e-mail: kolbin@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-5843-2779>, e-mail: gavrilova_vl@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1584-3169>, e-mail: puzankova@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-2072-6701>, e-mail: aronova@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-4524-4941>, e-mail: elsukova@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Классическая чума свиней относится к особо опасным болезням этого вида животных, вспышки которой ежегодно регистрируются в ряде стран. Несмотря на наличие средств специфической профилактики, опасность распространения заболевания в отдельной стране или во всем мире в целом сохраняется до сих пор. В связи с этим применение высокочувствительных методов ранней диагностики инфекции и определение наличия циркуляции вируса в природе являются необходимыми при надзоре и эрадикации данной болезни. Разработка новейших методов диагностики опирается на хорошо разработанную систему культивирования вируса, поэтому повышение уровня репродукции вируса классической чумы свиней, изучение возможности использования новых, лишенных эндогенной контаминации линий клеток до сих пор остается весьма актуальной задачей. Данная работа посвящена изучению чувствительности первичных и перевиваемых культур клеток к вирусу классической чумы свиней (вакцинных штаммов и ряда полевых изолятов, выделенных на территории России) с детекцией динамики его репродукции при помощи полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Также проведен анализ интенсивности репродукции вируса в первичных и перевиваемых культурах клеток, при этом установлено, что вирус классической чумы свиней не обладает способностью к размножению в некоторых из них без предварительной адаптации. Показано, что для накопления вируса как полевых изолятов, так и вакцинных штаммов целесообразно применять первичные культуры клеток тестикул свиньи и тестикул ягнят при добавлении в питательную среду 10%-й нормальной серонегативной к вирусу классической чумы свиней сыворотки свиньи, а не фетальной бычьей сыворотки. Определены параметры культивирования и оптимальный состав поддерживающих питательных сред, использование которых способствует увеличению накопления вируса в 4–10 раз как в первичных, так и в перевиваемых культурах клеток.

Ключевые слова: классическая чума свиней, изоляты вируса классической чумы свиней, вакцинные штаммы, культуры клеток, обратнo-транскрипционная полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, реакция прямой иммунофлуоресценции

Благодарности: Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам сектора культур клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ»: ведущему научному сотруднику Е. Г. Кузнецовой, ведущему технологу Е. А. Трофимовой и ведущему ветеринарному врачу Н. А. Колчанову. Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках проведения научно-исследовательских работ по теме «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Колбин И. С., Иголкин А. С., Гаврилова В. Л., Пузанкова О. С., Аронова Е. В., Елсукова А. А., Власова Н. Н. Определение репродуктивных свойств вируса классической чумы свиней вирулентных и вакцинных штаммов в первичных и перевиваемых культурах клеток. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (2): 149–155. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-149-155.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Колбин Иван Сергеевич, аспирант, ведущий биолог референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: kolbin@arriah.ru.

Determination of reproductive properties of virulent and vaccine classical swine fever virus strains in primary and continuous cell cultures

I. S. Kolbin¹, A. S. Igolkin², V. L. Gavrilova³, O. S. Puzankova⁴, Ye. V. Aronova⁵, A. A. Yelsukova⁶, N. N. Vlasova⁷

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>, e-mail: kolbin@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, e-mail: igolkin_as@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-5843-2779>, e-mail: gavrilo_vl@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1584-3169>, e-mail: puzankova@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-2072-6701>, e-mail: aronova@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0003-4524-4941>, e-mail: elsukova@arriah.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>, e-mail: vlasova_nn@arriah.ru

SUMMARY

Classical swine fever (CSF) is a highly dangerous porcine disease. CSF outbreaks are annually notified in several countries. Despite the availability of specific prevention tools, the disease spread risk still persists both at country level and at world level. Hence, the disease surveillance and eradication require highly sensitive methods for early diagnosis of the infection and for tests for the virus circulation in the environment. Development of up-to-date diagnostic methods is based on well-established virus cultivation system; therefore, CSF virus reproduction enhancement, tests of new cell lines without endogenous contamination for their possible use are still of current importance. The said study was aimed at testing of primary and continuous cell cultures for their susceptibility to classical swine fever virus (vaccine virus strains and some field virus isolates recovered in the Russian Federation) and detection of the virus reproduction dynamics with real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes used for detection. Virus replication intensity in primary and continuous cell cultures was also analyzed. The CSF virus was found incapable of replicating in some cell cultures without its preliminary adaptation. Primary porcine and lamb testicle cell cultures grown in minimal essential medium supplemented with 10% normal CSFV-negative porcine serum instead of fetal bovine serum were shown to be useful for the virus accumulation, both for vaccine strains and field isolates. Cultivation parameters and optimal minimal essential medium composition contributing to the 4–10-fold increase in the virus accumulation both in primary and continuous cell cultures were determined.

Keywords: classical swine fever (CSF), CSF virus isolates, vaccine virus strains, cell cultures, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with fluorescent hybridization probes used for detection, direct immunofluorescence test

Acknowledgements: The authors express their deep gratitude to the staff-members of the Cell Culture Unit of the FGBl "ARRIAH" Innovation Department: Ye. G. Kuznetsova (Leading Researcher), Ye. A. Trofimova (Leading Technologist) and N. A. Kolchanov (Leading Veterinarian). The study was funded by the federal budget as a part of the research activities "Animal Health and Welfare".

For citation: Kolbin I. S., Igolkin A. S., Gavrilo V. L., Puzankova O. S., Aronova Ye. V., Yelsukova A. A., Vlasova N. N. Determination of reproductive properties of virulent and vaccine classical swine fever virus strains in primary and continuous cell cultures. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 149–155. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-149-155.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Ivan S. Kolbin, Post-Graduate Student, Leading Biologist, Reference Laboratory for African Swine Fever FGBl "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: kolbin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Классическая чума свиней (КЧС) – высококонтагиозное инфекционное заболевание, характеризующееся лихорадкой, поражением кровеносной системы, респираторного и желудочно-кишечного трактов, сопровождающееся высокой заболеваемостью, а также летальностью домашних свиней и диких кабанов [1].

Согласно официальным данным Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) за 2021 г., только 38 стран на разных континентах являются благополучными по КЧС, и еще 3 страны имеют отдельные зоны благополучия. Сложная ситуация по КЧС складывается в азиатских и южноамериканских странах.

В неблагополучных странах КЧС наносит свиноводству большой экономический ущерб, обусловленный снижением продуктивности животных или их гибелью, а также необходимостью реализовывать принципы стемпинг аута при ликвидации очагов болезни. Для успешного развития свиноводства необходимо постоянно совершенствовать имеющиеся диагностические методы исследований, научно обоснованные подходы к борьбе и профилактике этой особо опасной болезни [2–3].

Современные диагностические методы являются необходимым инструментарием для выявления наличия возбудителя и изучения особенностей развития инфек-

ционного процесса на неблагополучной территории. Анализ арсенала применяемых в настоящее время методов позволяет разделить их как по выявлению целевого объекта (выявление вируса, детекция антигена, выявление антител и анализ генома), так и по назначению использования теста (индикация, идентификация, мониторинг, ретроспективная диагностика и т. д.) [3].

К основным методам выявления вируса КЧС и его антигена относят вирусовыделение возбудителя в культурах клеток с последующей детекцией в реакции прямой иммунофлуоресценции (РПИФ), иммуногистохимический анализ (ИГХ), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и, конечно, биопробу на восприимчивых животных, а для ретроспективной диагностики применяют реакцию непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления вирусспецифических антител [4–5].

При подозрении на КЧС окончательный диагноз устанавливается только на основании результатов лабораторных методов диагностики при условии подтверждения наличия возбудителя/генома или специфических антител в случае, если животное не было вакцинировано против КЧС [6].

С целью преодоления порога чувствительности используемого диагностического метода при определении наличия возбудителя в пробе, как правило для

увеличения его количества, возникает необходимость проведения двух-трех последовательных пассажей в различных чувствительных к вирусу КЧС первичных или перевиваемых культурах клеток [7].

Поскольку вирус КЧС не оказывает деструктивного воздействия на клетки, то для оперативного выявления наличия его репродукции в культуре применяют дополнительный метод детекции, например, такой как обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) [8].

В научно-исследовательских лабораториях для диагностики и изучения биологических свойств изолятов вируса КЧС часто используют биопробу на восприимчивых животных [9].

Для определения наличия жизнеспособного вируса, как правило, используют метод вирусыведения, суть которого заключается в инокуляции материала, потенциально содержащего вирус в восприимчивую культуру клеток. Поскольку вирус КЧС обладает способностью реплицироваться без предварительной адаптации в перевиваемой линии клеток почки поросят (РК-15), лейкоцитах периферической крови свиньи, спленоцитах свиньи (СС) и клетках костного мозга свиньи (КМС), вирусыведение этого инфекционного агента в большинстве случаев проводится на одной из этих культур [10].

Неспособность вируса КЧС вызывать цитопатический эффект при репродукции в различных клеточных линиях приводит к необходимости использования дополнительного детектирующего метода для выявления наличия репродукции вируса, например РПИФ или ОТ-ПЦР.

Накопление вируса КЧС для диагностических целей (наработка антигена, исследование структуры генома и т. п.) также проводится с использованием культур клеток. Однако в настоящий момент при получении препаративных количеств вируса КЧС с использованием первичных клеточных культур прослеживается ряд недостатков: трудоемкость получения суспензий клеток органов, нестандартность источника клеток для получения культуры, что препятствует точному воспроизведению результатов отдельных экспериментов и т. д.

Для стандартизации диагностических, вирусологических и молекулярно-генетических исследований подбирают новые, эффективные системы культивирования вируса КЧС, что позволяет стабильно получать в препаративных количествах образцы его антигена и генома [11–12].

Благодаря разработкам по созданию живых аттенуированных вакцин и усовершенствованию способов культивирования вируса КЧС в различных клеточных линиях, стало возможным продуктивное накопление вируса КЧС *in vitro* в клетках перевиваемой линии почки свиньи (IBRS), тестикул ягненка (ТЯ), свиной почки (СП) и т. д. [13–14].

Тем не менее для создания качественных систем репродукции необходимо решить проблемы, связанные с применением первичных культур клеток при выполнении исследовательских задач с целью получения больших объемов вирусосодержащего материала, или задачи по адаптации вируса КЧС к репродукции в перевиваемых линиях клеток [11].

Описанные затруднения частично преодолеваются использованием вируса КЧС, предварительно адаптированного к росту в перевиваемых линиях культур клеток, что существенно упрощает и стандартизирует

результаты многих диагностических и экспериментальных исследований, хотя наличие малого количества адаптированных штаммов вируса и накладывает определенные ограничения [13, 15].

Определение уровня репродукции при культивировании вируса КЧС в культурах клеток дает возможность изучить биологические свойства новых изолятов и поработать вирусосодержащий материал, который может быть использован для препаративного выделения генома вируса, что широко используется при определении родства возбудителей и установления вероятных путей распространения болезни [16].

Целью данной работы являлись отбор вирусных штаммов, обладающих высоким уровнем репродукции *in vitro*, и изучение репродуктивных свойств некоторых штаммов вируса КЧС в различных культурах клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие штаммы вируса КЧС:

- вакцинный штамм «Синлак», полученный из лапинизированного штамма «К» перемежающимися пассажами на культурах клеток РК-13, А₄С₂ и взрослых кроликах (предоставлен лабораторией профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ»);
- штамм CSF Amur 19-10/WB-12555, выделенный в 2019 г. от дикого кабана на территории Амурской области;
- референс-штамм «Ши-Мынь» 48-го пассажа на свиньях.

В опытах по изучению чувствительности различных культур клеток к вирусу КЧС использовали как первичные (СП – свиной почки, ТС – тестикул свиньи, ТЯ – тестикул ягнят), так и перевиваемые (ППЭС – почки эмбриона свиньи, ПСГК – почки сибирского горного козорога, S5s – селезенки свиньи (является субкультурой, линия прошла более 70 пассажей), IBRS – почки свиньи) клетки, полученные из сектора культур клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В качестве поддерживающей питательной среды при культивировании вируса КЧС в различных культурах клеток использовали питательную среду Игла-МЕМ, приготовленную по прописи ФГБУ «ВНИИЗЖ», с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и содержанием 50 мкг/см³ гентамицина, 2,5 мг/1000 см³ амфотерицина В и 0,3 мг/см³ глутамина.

Конфлюэнтный или субконфлюэнтный монослой клеток инфицировали вирусом КЧС со множественностью заражения не менее 0,1–1,0 ККИД₅₀/кл.

Для заражения культур клеток использовали следующие методы:

1. Заражение без адсорбции – вирус вносили в культуральные флаконы с полностью сформированным клеточным монослоем 2–3-суточных первичных и перевиваемых культур клеток.

2. Заражение с адсорбцией – контакт проводили при температуре 37 °С в течение 60 мин, после чего в культуральный флакон добавляли необходимый объем питательной среды. Для контроля оставляли незараженную культуру клеток, в которой меняли только поддерживающую среду. Ежедневно проводили визуальную регистрацию наличия изменений и степени отторжения клеток от стекла с помощью инвертированного лабораторного микроскопа с бинокулярным тубусом СКХ41 PhP FL US50 (Olympus, Япония).

Таблица 1

Результаты анализа в ОТ-ПЦР-РВ проб, отобранных на 3–4-е сут из культуральной жидкости и клеточной суспензии при культивировании вируса КЧС в первичной и перевиваемых культурах клеток ($n = 3$)

Table 1

Results of rtRT-PCR tests of culture fluid and cell suspension samples collected on day 3–4 of CSF virus cultivation in primary and continuous cell cultures ($n = 3$)

Штамм вируса КЧС	Культура клеток	Среднее значение Ct*	
		из культуральной среды	из клеточной суспензии
CSF Amur 19-10/WB-12555	СП	16,4	18,27
	ПСГК	18,25	20,01
	ППЭС	19,66	21,48
	SSs	15,52	17,02
«Ши-Мынь»	СП	17,83	19,11
	ПСГК	17,63	19,64
	ППЭС	17,94	19,86
	SSs	15,85	17,19

* среднее значение Ct при исследовании 3 образцов (average Ct value for 3 tested samples).

Результаты ОТ-ПЦР-РВ оценивают в соответствии с инструкцией производителя (real-time RT-PCR results interpreted in accordance with the rtRT-PCR kit manufacturer are as follows):

– положительный результат – значение Ct не превышает 33,0

(positive result – Ct value is not higher than 33.0);

– сомнительный результат – значение Ct превышает 33,0 (inconclusive result – Ct value is higher than 33.0);

– отрицательный результат – значение Ct отсутствует (negative result – Ct value is absent).

Таблица 2

Результаты исследования методом ОТ-ПЦР-РВ проб, отобранных при культивировании вируса КЧС в первичной и перевиваемых культурах клеток при заражении монослоя клеток с адсорбцией и без адсорбции ($n = 3$)

Table 2

Results of rtRT-PCR tests of culture fluid samples collected during CSF virus cultivation in primary and continuous cell culture when the cell monolayer was infected with or without adsorption ($n = 3$)

Штамм вируса КЧС	Культура клеток	Среднее значение Ct*	
		заражение без адсорбции	заражение с адсорбцией
CSF Amur 19-10/WB-12555	SSs	16,27	20,91
	СП	16,22	16,26
	ППЭС	13,76	17,74
	ПСГК	15,18	15,50
«Ши-Мынь»	SSs	10,78	10,82
	СП	12,97	14,37
	ППЭС	16,03	16,51
	ПСГК	12,14	12,17

* среднее значение Ct при исследовании 3 образцов (average Ct value for 3 tested samples).

Результаты ОТ-ПЦР-РВ оценивают в соответствии с инструкцией производителя (real-time RT-PCR results interpreted in accordance with the rtRT-PCR kit manufacturer are as follows):

– положительный результат – значение Ct не превышает 33,0

(positive result – Ct value is not higher than 33.0);

– сомнительный результат – значение Ct превышает 33,0 (inconclusive result – Ct value is higher than 33.0);

– отрицательный результат – значение Ct отсутствует (negative result – Ct value is absent).

3. Заражение со сменой питательной среды – в качестве поддерживающей питательной среды использовали среду Игла-МЕМ с добавлением 10%-й нормальной сыворотки свиньи (для сравнения применяли свежеприготовленную и замороженную сыворотку свиньи). До заражения культуры проводили смену среды пу-

тем добавления 10 мл среды Игла-МЕМ, содержащей 10%-ю нормальную сыворотку свиньи.

Культуру клеток в пластиковых флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см² (T25) инкубировали в термостате или в CO₂-инкубаторе при (37 ± 2) °C в течение 72–96 ч. По истечении указанного срока из культуральных флаконов для постановки ОТ-ПЦР-РВ отбирали пробы:

– из культуральной среды в объеме не менее 100 мкл;

– из клеточной суспензии в объеме не менее 100 мкл.

Проведение последующих пассажей осуществляли либо прямым переносом вирусосодержащей суспензии в свежую культуру клеток, либо после трехкратного замораживания – оттаивания культуральной жидкости предыдущего пассажа.

При отсутствии цитопатического действия вируса КЧС его наличие определяли путем выявления возбудителя или антигена с использованием РПИФ в соответствии с «Методическими указаниями по выделению вируса классической чумы свиней на различных культурах клеток с идентификацией возбудителя в реакции иммунофлуоресценции» [17], или его РНК методом ОТ-ПЦР-РВ согласно «Методическим рекомендациям по выделению вируса классической чумы свиней на первичных культурах клеток (СС, КМС, СП, ТЯ, ТС) с идентификацией возбудителя методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени» [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения особенностей репродукции вируса КЧС в первичных и перевиваемых культурах клеток провели сравнительный анализ уровня накопления вирулентных вариантов возбудителя: штамма CSF Amur 19-10/WB-12555, референс-штамма «Ши-Мынь», а также вакцинного штамма «Синлак».

Скорость репродукции оценивали по времени максимального выхода вируса в питательную среду. С этой целью отобранные на 3–4-е сут пробы культуральной жидкости и клеток монослоя анализировали в ОТ-ПЦР-РВ (согласно инструкции по применению тест-системы), исходя из того, что самые высокие значения порогового цикла (Ct) соответствуют минимальному уровню накопления вируса КЧС [19].

Как видно из результатов, приведенных в таблице 1, на 3–4-е сут культивирования вируса КЧС более 90% вирусного материала находится не в клетках, а в культуральной жидкости. Максимальное накопление вируса с выходом вируса в питательную среду регистрировали в культурах клеток СП и SSs.

На следующем этапе для анализа эффективности заражения провели сравнение двух методов инфицирования клеток: внесение вируса непосредственно в питательную среду и с адсорбцией на монослое клеток в течение часа. Как и в предыдущих экспериментах, уровень накопления оценивали в ОТ-ПЦР-РВ по показателям Ct.

Из представленных в таблице 2 данных следует, что существенных различий в накоплении вируса между заражением культуры клеток с адсорбцией на монослое и внесением вирусосодержащего материала в питательную среду не наблюдалось. Единственное значимое различие отмечалось для вируса КЧС штамма CSF Amur 19-10/WB-12555 при репродукции на культуре клеток SSs, когда значение Ct при инфицировании клеток с адсорбцией составило 20,91, а без адсорбции – 16,27.

Проанализировав результаты, полученные для четырех разных культур, установили, что эффективность заражения культуры клеток с адсорбцией была выше на 8,8% по сравнению с использованием метода инокуляции вируса КЧС в культуральную среду.

Для улучшения регенерационной способности культуры клеток и увеличения количества прикрепленных клеток к поверхности культурального флакона в поддерживающую питательную среду добавляли 10%-ю инактивированную нормальную свиновую сыворотку. В данном эксперименте для сравнения помимо вирулентных штаммов использовали вакцинный штамм «Синлак» вируса КЧС.

Предварительно, до начала эксперимента и анализа данных по вакцинному штамму «Синлак» вируса КЧС, провели три последовательных пассажа на первичных культурах клеток ТС и ТЯ для достижения желаемых значений Ct (10–12) в ОТ-ПЦР-РВ. Далее для сравнительного анализа также вносили в поддерживающую питательную среду 10%-ю инактивированную нормальную свиновую сыворотку и параллельно проводили накопление вируса в среде с 10%-й фетальной свиновой сывороткой крупного рогатого скота.

Анализируя представленные в таблице 3 данные, следует отметить, что наилучшие репродукционные свойства вируса КЧС отмечаются при использовании метода со сменой питательной среды и с добавлением 10%-й нормальной свиновой сыворотки. Существенное снижение значений Ct, свидетельствующее об увеличении показателей титра вируса, регистрировали при данных условиях как для вирулентных, так и для вакцинного штамма вируса КЧС.

Установлено, что наиболее низкие значения Ct в ОТ-ПЦР-РВ наблюдаются на первичных культурах клеток ТС и ТЯ (для вакцинного штамма), что соответствует более высокому накоплению вируса в них. Данное соотношение регистрировали как у вакцинного, так и у вирулентных штаммов. Проанализировав значения Ct для проб, отобранных с культур клеток СП и IBRS, можно сделать вывод, что использование их для накопления вируса неэффективно, поэтому необходимо проводить предварительную адаптацию вируса КЧС к данным культурам клеток.

Таким образом, установили, что эффективность использования культуры клеток ТС при накоплении вируса КЧС (вирулентных и вакцинного штаммов) на 58% выше, чем при использовании культур ТЯ, СП и IBRS.

В последующих экспериментах провели сравнение эффективности применения свежеприготовленной и замороженной нормальных свиновых сывороток при смене питательной среды.

Как показали результаты исследования, наиболее высокие значения порогового цикла, выявляемые методом ОТ-ПЦР-РВ, наблюдали в опыте с использованием замороженной свиновой сыворотки. Однако нельзя исключать тот факт, что использованная в данном эксперименте свежеприготовленная свиная сыворотка крови могла содержать большое количество антител к вирусу КЧС и, следовательно, снизить интенсивность репродукции возбудителя. Из этого следует, что перед добавлением свиновой сыворотки в питательную среду необходимо анализировать ее на наличие антител к вирусу КЧС методом ИФА.

По результатам проведенной серии экспериментов отмечено, что лучшие репродуктивные свойства вирус КЧС проявляет на первичной культуре клеток ТС,

Таблица 3

Результаты ОТ-ПЦР-РВ для проб, отобранных при культивировании вируса КЧС в первичных и перевиваемой культурах клеток без смены и со сменой поддерживающей питательной среды с добавлением 10%-й нормальной свиновой сыворотки (n = 3)

Table 3

Results of rtRT-PCR tests of culture fluid samples collected during CSF virus cultivation in primary and continuous cell culture with or without changing of minimal essential medium supplemented with 10% normal porcine serum (n = 3)

Штамм вируса КЧС	Культура клеток	Среднее значение Ct*	
		без смены питательной среды	со сменой питательной среды
«Синлак»	ТС	9,41	8,22
	ТЯ	12,18	14,29
	СП	23,84	21,93
CSF Amur 19-10/ WB-12555	ТС	11,09	10,69
	СП	14,98	14,52
	IBRS	16,56	16,10
«Ши-Мынь»	ТС	8,08	7,17
	СП	12,37	11,71
	IBRS	13,83	13,74

* среднее значение Ct при исследовании 3 образцов (average Ct value for 3 tested samples).

Результаты ОТ-ПЦР-РВ оценивают в соответствии с инструкцией производителя (real-time RT-PCR results interpreted in accordance with the rtRT-PCR kit manufacturer are as follows):

– положительный результат – значение Ct не превышает 33,0

(positive result – Ct value is not higher than 33.0);

– сомнительный результат – значение Ct превышает 33,0 (inconclusive result – Ct value is higher than 33.0);

– отрицательный результат – значение Ct отсутствует (negative result – Ct value is absent).

Таблица 4

Результаты ОТ-ПЦР-РВ при культивировании вируса КЧС в первичных культурах клеток ТЯ, ТС с добавлением к питательной среде свежеприготовленной или замороженной 10%-й свиновой сыворотки (n = 3)

Table 4

Results of rtRT-PCR tests of culture fluid samples collected during CSF virus cultivation in primary porcine testicle and lamb testicle cell cultures in minimal essential medium supplemented with freshly prepared or frozen 10% porcine serum (n = 3)

Штамм вируса КЧС	Культура клеток	Среднее значение Ct*	
		с добавлением свежей свиновой сыворотки	с добавлением замороженной свиновой сыворотки
«Синлак»	ТЯ	17,57	13,26
	ТС	16,48	11,16
CSF Amur 19-10/ WB-12555	ТС	15,63	14,71
«Ши-Мынь»	ТС	15,09	12,08

* среднее значение Ct при исследовании 3 образцов (average Ct value for 3 tested samples).

Результаты ОТ-ПЦР-РВ оценивают в соответствии с инструкцией производителя (real-time RT-PCR results interpreted in accordance with the rtRT-PCR kit manufacturer are as follows):

– положительный результат – значение Ct не превышает 33,0

(positive result – Ct value is not higher than 33.0);

– сомнительный результат – значение Ct превышает 33,0 (inconclusive result – Ct value is higher than 33.0);

– отрицательный результат – значение Ct отсутствует (negative result – Ct value is absent).

среднее значение порогового цикла Ct при использовании данной культуры составляет 12,89.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку для создания диагностикумов необходимо накопление препаративных количеств антигена или генома вируса КЧС, достижение высокого уровня

репродукции вируса КЧС в культуре клеток являлось основной целью проведенных исследований. Определили, что максимальное накопление вируса КЧС наблюдается на 3–4-е сут с выходом его в питательную среду. Использование метода заражения культуры клеток с адсорбцией оказалось малоэффективным. Целесообразно добавление отрицательной на наличие антител к вирусу КЧС 10%-й свиной сыворотки крови, а не бычьей фетальной.

На основании проведенных исследований по определению репродуктивных свойств вируса КЧС вирулентных и вакцинных штаммов в первичных и перевиваемых культурах клеток для дальнейшей разработки диагностических препаратов были отобраны: вакцинный штамм «Синлак», который эффективно накапливается в культурах клеток ТС и ТЯ при добавлении в питательную среду 10%-й нормальной сыворотки свиньи, и вирулентный штамм CSF Amur 19-10/WB-12555, происходящий от изолята, выделенного в 2019 г. от дикого кабана на территории Амурской области РФ. Для накопления вируса данного штамма также целесообразно использование культуры клеток ТС.

В дальнейшей перспективе изучения отобранных штаммов для использования в диагностических целях необходимо провести генетический анализ этих вариантов вируса КЧС, что даст возможность определить наличие у них уникальных генетических маркеров, которые позволят дифференцировать изоляты и штаммы данного вируса.

Резюмируя вышеизложенное, стоит отметить, что в области эрадикации и контроля распространения КЧС важной разработкой будет являться DIVA-стратегия как улучшенный инструмент, который может успешно применяться в странах, где КЧС энзоотична, для мониторинга циркуляции вируса и в неблагополучных по КЧС странах для минимизации распространения вируса и экономического ущерба в случае возникновения вспышки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жестерев В. И., Балышева В. И., Чурбанова Г. Н., Устаров Р. Д., Зув В. В. Изучение некоторых биологических свойств вируса КЧС. *Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней – неотложные проблемы науки и практики» (9–11 ноября 1994 г.)*. Покров; 1995; 14–15. eLIBRARY ID: 20845304.
- Барышников П. И. Ветеринарная вирусология: учебное пособие. Барнаул: Изд-во АГАУ; 2006. 113 с.
- Крупальник В. Л., Наврузшоева Г. Ш. Классическая и африканская чума свиней: Лекция. М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К. И. Скрябина; 2012. 37 с.
- Федорова А. А., Корпусова Т. И., Петрова О. Н., Решетников Г. Г., Ковалишин В. Ф., Пронин И. А. и др. Иммунобиологические свойства культурального штамма вируса классической чумы свиней. *Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: материалы Международной научной конференции молодых ученых (24–26 марта 2004 г.)*. Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ»; 2004; 100–101.
- Бабкин Н. В. Использование метода флуоресцирующих антител для определения чувствительности культур клеток к вирусу КЧС. *Ветеринарная медицина*. Харьков; 2005; 85: 50–52.
- Вишняков И. Ф., Митин Н. И., Карпов Г. М., Куринов В. В., Яшин А. Т. Диагностика и дифференциальная диагностика африканской и классической чумы свиней. *Ветеринария*. 1991; 4: 28–31. eLIBRARY ID: 18836843.
- Егорова А. И., Толочков А. С., Филина А. Ю., Окулова О. Н. Выявление вируса КЧС в полевых материалах методом реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в перевиваемых гибридных клетках. *Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: тезисы докладов конференции, посвященной 100-летию открытия вируса ящура (27–31 октября 1997 г.)*. Владимир; ВНИИЗЖ; 1997; 118.
- Безбородова С. В., Дрыгин В. В., Перевозчикова Н. А. Повышение чувствительности и специфичности метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления вируса классической чумы свиней (КЧС).

Вирусные болезни сельскохозяйственных животных: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции (17–23 апреля 1995 г.). Владимир: ВНИИЗЖ; 1995; 15.

9. Gallei A., Rümenapf T., Thiel H. J., Becher P. Characterization of helper virus-independent cytopathogenic classical swine fever virus generated by an *in vivo* RNA recombination system. *J. Virol.* 2005; 79 (4): 2440–2448. DOI: 10.1128/JVI.79.4.2440-2448.2005.

10. Филина А. Ю., Герасимов В. Н., Байбиков Т. З., Егорова А. И. Культивирование различных штаммов вируса классической чумы свиней в перевиваемых культурах клеток. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2007; 5: 278–284. eLIBRARY ID: 14454067.

11. Сергеев В. А., Орлянкин Б. Г., Алексеев К. П., Забережный А. Д., Алипер Т. И., Непоклонов Е. А. Вакцины и стратегия вакцинации против классической чумы свиней. *Ветеринария*. 2018; 4: 3–11. eLIBRARY ID: 32825056.

12. Гребенникова Т. В., Забережный А. Д., Алипер Т. И., Непоклонов Е. А. Генетическая характеристика вакцинного штамма КС вируса классической чумы свиней: сравнительный анализ первичной последовательности генов поверхностных гликопротеинов E^{ms}, E1, E2. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 1999; 2: 34–40. eLIBRARY ID: 21818654.

13. Raut S. D., Rajak K. K., Kumar R., Singh V. K., Saxena A., Chaudhary D., et al. Characterization of cytopathogenicity of classical swine fever virus isolate induced by Newcastle disease virus. *Virus Disease*. 2015; 26 (1-2): 70–76. DOI: 10.1007/s13337-015-0253-0.

14. Zhang H., Leng C., Feng L., Zhai H., Chen J., Liu C., et al. A new subtype 2.1d isolates of classical swine fever virus in China, 2014. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 34: 94–105. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.031.

15. Коломыцев А. А., Миколайчук С. В. Анализ выполнения мероприятий по борьбе с классической чумой свиней, принятых на всесоюзном и всероссийском уровнях, разрабатываемых ВНИИВВиМ. *Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней – неотложные проблемы науки и практики» (9–11 ноября 1994 г.)*. Покров; 1995; 107–108. eLIBRARY ID: 20844475.

16. Перзашкевич В. С., Кадетов В. В., Цыбанов С. Ж., Куринов В. В., Балышева В. И. Очистка вируса классической чумы свиней. *Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы научно-практической конференции ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней – неотложные проблемы науки и практики» (9–11 ноября 1994 г.)*. Покров; 1995; 20–21. eLIBRARY ID: 20849169.

17. Методические указания по выделению вируса классической чумы свиней на различных культурах клеток с идентификацией возбудителя в реакции иммунофлуоресценции: утв. Россельхознадзором 13.09.2017 МУ 19-17. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2017. 21 с.

18. Колбин И. С., Власова Н. Н., Иголкин А. С., Елсукова А. А., Гаврилова В. Л., Пузанкова О. С. Методические рекомендации по выделению вируса классической чумы свиней на первичных культурах клеток (СС, КМС, СП, ТЯ, ТС) с идентификацией возбудителя методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 14.09.2021 № 42-21. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2021. 56 с.

19. Инструкция по применению тест-системы «КЧС» для выявления возбудителя классической чумы свиней методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: утв. 26.10.2020. М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. 2020. 25 с.

REFERENCES

- Gesterev V. I., Balyshcheva V. I., Churbanova G. N., Ustarov R. D., Zuev V. V. Izuchenie nekotorykh biologicheskikh svoystv virusa KChS = Study of some CSF biological properties. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi virusologii: materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii VNIIVViM «Klassicheskaya chuma svinei – neotlozhnye problemy nauki i praktiki» (9–11 noyabrya 1994 g.) = Current aspects of veterinary virology: Proceedings of the Scientific and Practical Conference held at the All-Russia Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology: "Classical swine fever – urgent scientific and practical challenges" (November 9–11, 1994)*. Pskov; 1995; 14–15. eLIBRARY ID: 20845304. (in Russ.)
- Baryshnikov P. I. *Veterinary virology: study guide*. Barnaul: ASAU Publishing House; 2006. 113 p. (in Russ.)
- Krupalnik V. L., Navruzshoeva G. S. *Classical and African swine fever: Lecture*. Moscow: Moscow SAVMB; 2012. 37 p. (in Russ.)
- Fedorova A. A., Korpusova T. I., Petrova O. N., Reshetnikov G. G., Kovalev I. V., Pronin I. A., et al. Immunobiological properties of culture classical swine fever virus strain. *Problemy monitoringa i genodiagnostiki infeksionnykh bolezney zhivotnykh: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchennykh (24–26 marta 2004 g.) = Problems of monitoring and genodiagnostics of infectious animal diseases: proceedings*

of the International Scientific Conference of Young Scientists (March 24–26, 2004). Vladimir: FGI "ARRIAH"; 2004; 100–101. (in Russ.)

5. Babkin N. V. Ispol'zovanie metoda fluorestsiruyushchikh antitel dlya opredeleniya chuvstvitel'nosti kul'tur kletok k virusu KChS = Use of fluorescent antibody technique for testing cell cultures for their sensitivity to CSF virus. *Veterinary Medicine*. Kharkiv; 2005; 85: 50–52. (in Russ.)

6. Vishnyakov I. F., Mitin N. I., Karpov G. M., Kurinnov V. V., Yashin A. T. Diagnostika i differentsial'naya diagnostika afrikanской i klassicheskoi chumy svinei = African and classical swine fever diagnosis and differential diagnosis. *Veterinariya*. 1991; 4: 28–31. eLIBRARY ID: 18836843. (in Russ.)

7. Egorova A. I., Toloknov A. S., Filina A. Yu., Okulova O. N. Vyyavlenie virusa KChS v polevykh materialakh metodom reaktsii immunofluoresentsii (RIF) v perevivaemykh gibridnykh kletkakh = Detection of CSF virus in field samples with immunofluorescence test (IFT) in continuous hybrid cells. *Problemy infektsionnoi patologii sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh: tezisy dokladov konferentsii, posvyashchennoi 100-letiyu otkrytiya virusa yashchura (27–31 oktyabrya 1997 g.) = Aspects of infectious pathology in livestock animals: Abstracts of the Conference dedicated to the 100 anniversary of FMD virus discovery (October 27–31, 1997)*. Vladimir; ARRIA; 1997; 118. (in Russ.)

8. Bezborodova S. V., Drygin V. V., Perevozchikova N. A. Povyshenie chuvstvitel'nosti i spetsifichnosti metoda polimeraznoi tsepnoi reaktsii (PTsR) dlya vyyavleniya virusa klassicheskoi chumy svinei (KChS) = Improved sensitivity and specificity of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of classical swine fever virus. *Virusnye bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh: tezisy dokladov Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (17–23 aprelya 1995 g.) = Viral diseases of livestock animals: abstracts of the All-Russia Scientific and Practical Conference (April 17–23, 1995)*. Vladimir; ARRIA; 1995; 15. (in Russ.)

9. Gallei A., Rümepapf T., Thiel H. J., Becher P. Characterization of helper virus-independent cytopathogenic classical swine fever virus generated by an in vivo RNA recombination system. *J. Virol.* 2005; 79 (4): 2440–2448. DOI: 10.1128/JVI.79.4.2440-2448.2005.

10. Filina A. Yu., Gerasimov V. N., Baibikov T. Z., Yegorova A. I. Cultivation of different classical swine fever virus strains in continuous cell cultures. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2007; 5: 278–284. eLIBRARY ID: 14454067. (in Russ.)

11. Sergeyev V. A., Orlyankin B. G., Alekseyev K. P., Zaberezhny A. D., Aliper T. I., Nepoklonov E. A. Vaccines and vaccination strategies against classical swine fever. *Veterinariya*. 2018; 4: 3–11. eLIBRARY ID: 32825056. (in Russ.)

12. Grebennikova T. V., Zaberezhny A. D., Aliper T. I., Nepoklonov E. A. Geneticheskaya kharakteristika vaktsinnogo shtamma KS virusa klassicheskoi chumy svinei: sravnitel'nyi analiz pervichnoi posledovatel'nosti genov poverkhnostnykh glikoproteinov E^{ms}, E1, E2 = Genetic characterization of KS strain of classical swine fever virus: comparative analysis of primary sequences of E^{ms}, E1, E2 surface glycoprotein genes. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 1999; 2: 34–40. eLIBRARY ID: 21818654. (in Russ.)

13. Raut S. D., Rajak K. K., Kumar R., Singh V. K., Saxena A., Chaudhary D., et al. Characterization of cytopathogenicity of classical swine fever

virus isolate induced by Newcastle disease virus. *Virus Disease*. 2015; 26 (1-2): 70–76. DOI: 10.1007/s13337-015-0253-0.

14. Zhang H., Leng C., Feng L., Zhai H., Chen J., Liu C., et al. A new subtype 2.1d isolates of classical swine fever virus in China, 2014. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 34: 94–105. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.031.

15. Kolomytsev A. A., Mikolaichuk S. V. Analiz vypolneniya meropriyatii po bor'be s klassicheskoi chumoi svinei, prinyatykh na vsesoyuznom i vserossiiskom urovnyakh, razrabatyvaemykh VNIIVViM = Analysis of implementation of the measures for classical swine fever control developed by the All-Russia Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology adopted at all-USSR and all-Russian Federation levels. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi virusologii: materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii VNIIVViM «Klassicheskaya chuma svinei – neotlozhnye problemy nauki i praktiki» (9–11 noyabrya 1994 g.) = Current aspects of veterinary virology: Proceedings of the Scientific and Practical Conference held at the All-Russia Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology: "Classical swine fever – urgent scientific and practical challenges" (November 9–11, 1994)*. Pokrov; 1995; 107–108. eLIBRARY ID: 20844475. (in Russ.)

16. Perzashkevich V. S., Kadetov V. V., Tsybanov S. Zh., Kurinnov V. V., Balyshova V. I. Ochistka virusa klassicheskoi chumy svinei = Purification of classical swine fever virus. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi virusologii: materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii VNIIVViM «Klassicheskaya chuma svinei – neotlozhnye problemy nauki i praktiki» (9–11 noyabrya 1994 g.) = Current aspects of veterinary virology: Proceedings of the Scientific and Practical Conference at the All-Russia Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology: "Classical swine fever – urgent scientific and practical challenges" (November 9–11, 1994)*. Pokrov; 1995; 20–21. eLIBRARY ID: 20849169. (in Russ.)

17. Methodical Guidelines for classical swine fever virus isolation in different cell cultures followed by the virus identification with immunofluorescence test: approved by the Rosselkhoz nadzor on 13 September 2017, MG 19-17. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2017. 21 p. (in Russ.)

18. Kolbin I. S., Vlasova N. N., Igolkin A. S., Elskova A. A., Gavrilova V. L., Puzankova O. S. Methodical Guidelines for classical swine fever virus isolation in primary cell cultures (PS, PBM, PK, PT, LT) followed by the virus identification with real-time polymerase chain reaction including detection using fluorescent hybridization probes: approved by the FGBI "ARRIAH" on 14 September 2021, No. 42-21. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2021. 56 p. (in Russ.)

19. Instruction on use of CSF test kit for detection of classical swine fever agent with real-time polymerase chain reaction including detection using fluorescent hybridization probes: approved on 26 October 2020. Moscow: Federal Budgetary Scientific Institution "Central Research Institute of Epidemiology" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. 2020. 25 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 25.02.2022

Поступила после рецензирования / Revised 05.04.2022

Принята к публикации / Accepted 12.05.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Колбин Иван Сергеевич, аспирант, ведущий биолог референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Иголкин Алексей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Гаврилова Вера Львовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Пузанкова Ольга Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Аронова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Елсукова Александра Андреевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Власова Наталья Никифоровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Ivan S. Kolbin, Post-Graduate Student, Leading Biologist, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexey S. Igolkin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vera L. Gavrilova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Olga S. Puzankova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Yelena V. Aronova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Alexandra A. Yelsukova, Candidate of Science (Biology), Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Natalia N. Vlasova, Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.