

8. Liu, S.; Xue, H.; Pu, B.; Qian, N. A new viral disease in rabbit. Anim. Husb. Vet. Med. 1984, 16, 253–255.

9. Lavazza, A.; Capucci, L. Chapter 3.6.2.—Rabbit haemorrhagic disease. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019, 8th ed.; OIE: Paris, France, 2018; pp. 1389–1406

УДК 619:616.98:578.842.1:577.21

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КИНЕТИКИ РЕПЛИКАЦИИ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА EP402R И ЕГО «РОДИТЕЛЬСКОГО» ШТАММА KK262 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Крутько Сергей Александрович, санитар, ФГБНУ ФИЦВиМ

Кольцов Андрей Юрьевич, в.н.с., ФГБНУ ФИЦВиМ

Сухер Михаил Михайлович, начальник группы лаборатории, ФГБНУ ФИЦВиМ

Чадаева Анна Александровна, м.н.с., ФГБНУ ФИЦВиМ

Кольцова Галина Сергеевна, к.б.н., зав. лабораторией, ФГБНУ ФИЦВиМ

***Аннотация.** В данном исследовании была проведена сравнительная оценка репликации двух гомологичных штаммов вируса АЧС в трех клеточных линиях свиного происхождения. Результаты показали, что рекомбинантный штамм с делецией гена EP402R (Δ CongoCD2v) продемонстрировал более высокую репликативную активность в исследуемых клеточных линиях.*

***Ключевые слова:** АЧС, культуры клеток, делеционные штаммы, репликация вируса, Δ CongoCD2v.*

Африканская чума свиней (АЧС) представляет собой крупный и сложный ДНК-вирус. Несмотря на наличие более 150 генов, функции большинства из них остаются неизученными [1].

Для изучения роли конкретных генов в развитии инфекции и вирулентности вируса ученые используют методы генной инженерии, создавая рекомбинантные вирусы АЧС с удаленными генами. Этот подход оказался ценным инструментом для разработки экспериментальных вакцин.

Разработка эффективной и безопасной вакцины против АЧС сталкивается с рядом проблем, и одной из ключевых является отсутствие подходящей линии клеток для культивирования вируса.

Хотя вирус АЧС поражает преимущественно моноциты и макрофаги, его размножение возможно и в некоторых перевиваемых клеточных линиях, но с гораздо меньшей эффективностью. Макрофаги, широко используемые для изучения взаимодействия вируса с клеткой-хозяином, реагируют на заражение вирулентными и аттенуированными штаммами АЧС по-разному [2,3].

Однако использование первичных культур макрофагов для производства вакцины сопряжено с рядом сложностей. Во-первых, получение первичных клеток – дорогостоящий и трудоемкий процесс. Во-вторых, существует риск контаминации культур, что может привести к гибели клеток. И, наконец, использование животных клеток в промышленных масштабах неэтично и непрактично [3]. Таким образом, поиск подходящей клеточной линии для репликации вируса АЧС является важным шагом на пути к созданию эффективной и доступной вакцины.

Рекомбинантный штамм Δ CongoCD2 вируса АЧС, с делецией гена EP402R, кодирующего белок CD2v, был получен из аттенуированного штамма KK262 (Congo-a) сотрудниками ФГБНУ ФИЦВиМ. С целью селекции и для анализа репликации и распространения в геном рекомбинантного штамма был включен ген EGFP под контролем промотора гена B646L (p72). Ранее нами было показано, что данный вирус эффективно реплицировался в первичных культурах клеток (костного мозга и макрофагов) и в культуре клеток COS-1, однако его репликация в организме хозяина была снижена, а иммунизации им не обеспечивала защиту от заражения гомологичным штаммом вируса АЧС K49 (Congo-v) [4,5].

Поскольку ранее было установлено, что исследуемые штаммы вируса успешно реплицируются в клеточной линии COS-1, мы решили расширить исследование и сравнить их способность к размножению в других перевиваемых клеточных линиях [6]. В работе проведено сравнение кинетики репликации исходного и рекомбинантного штаммов вируса АЧС на трех клеточных линиях свиного происхождения: SK-6 (перевиваемая линия клеток почки свиньи), A4C2/9к (перевиваемая клеточная линия спленоциты свиньи), РТР (культура клеток тестикул поросенка).

В данном исследовании сравнивали кинетику репликации двух штаммов вируса АЧС «родительского» штамма KK-262 (Congo-a) и штамма с делецией гена EP402R (Δ CongoCD2v) в культуре клеток РТР. Наблюдение проводили в течение 120 часов (рисунок 1). Рост клеток происходил преимущественно на более широкой поверхности монослоя клеток. Максимальная концентрация рекомбинантного штамма вируса АЧС Δ CongoCD2v составила $10^{7.5}$ копий генома на миллилитр после 120 часов множественного заражения при 0.1 MOI. Для родительского штамма вируса АЧС Congo-a кинетика роста достигала 10^7 копий генома при множественном заражении 0.1 MOI.

В культуре клеток A4C2/9к кинетика роста рекомбинантного вируса АЧС Δ CongoCD2v и родительского штамма вируса АЧС Congo-a по сравнению практически не различалась. При множественном заражении культуры клеток при 0.1 MOI максимальные титры были достигнуты через 96 часов. Кинетика роста родительского штамма вируса АЧС Congo-a в этой культуре клеток достигла максимального титра на 96 часов и составила 10^7 копий генома на миллилитр. Максимальная концентрация рекомбинантного штамма вируса АЧС Δ CongoCD2v составила 10^8 копий генома на миллилитр после 120 часов множественного заражения при 0.1 MOI. (рис. 1).

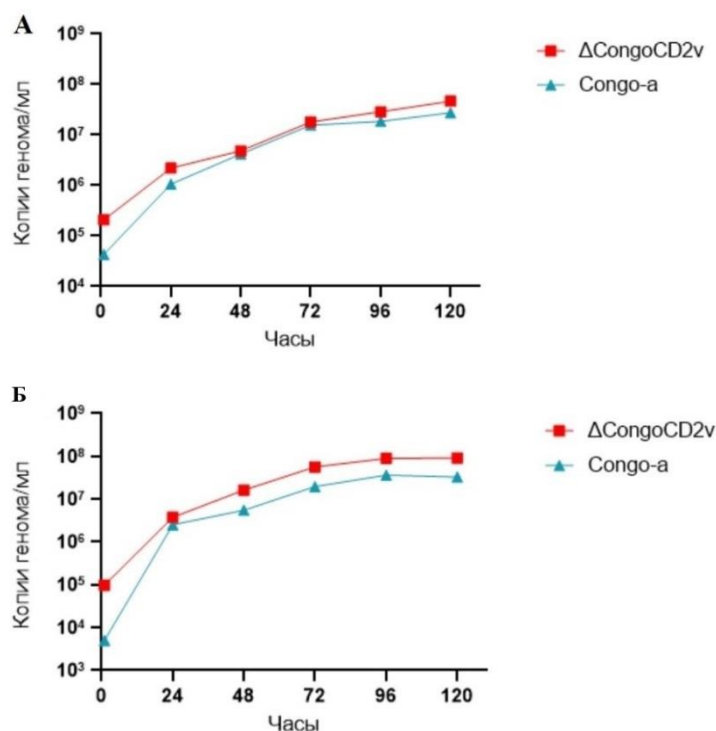


Рисунок 1. Кинетика роста *in vitro* родительского вируса Congo-a и рекомбинантного вируса АЧС ΔCongoCD2v в перевиваемых культурах клеток: (А) РТР; многоступенчатые кривые роста рекомбинантного вируса ΔCongoCD2v и родительского вируса Congo-a при множественном заражении MOI 0.1; (Б) А4С2/9к; многоступенчатые кривые роста рекомбинантного вируса ΔCongoCD2v и родительского вируса Congo-a при множественном заражении MOI 0.1.

Оценка репродуктивных характеристик рекомбинантного штамма вируса АЧС ΔCongoCD2v и родительского штамма Congo-a в культуре клеток SK-6 выявила снижение эффективности их репликации в сравнении с другими клеточными линиями (рис. 2).

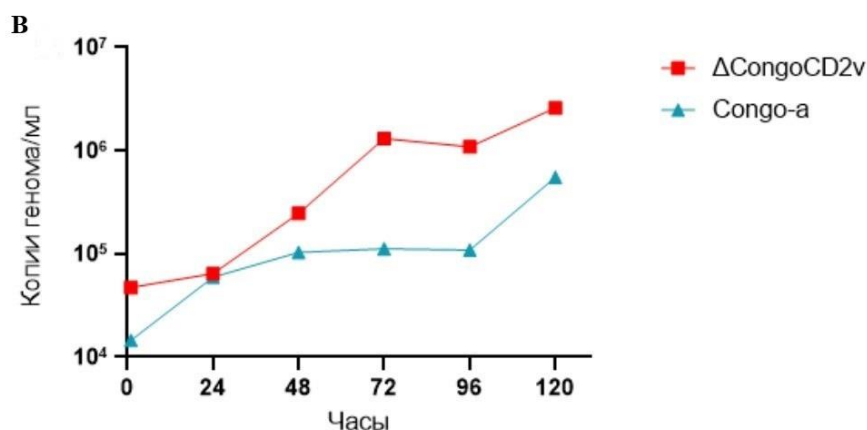


Рисунок 2. Кинетика роста *in vitro* родительского вируса Congo-a и рекомбинантного вируса АЧС ΔCongoCD2v в перевиваемых культурах клеток SK-6; многоступенчатые кривые роста рекомбинантного вируса ΔCongoCD2v и родительского вируса Congo-a при множественном заражении MOI 0.1.

Выбор оптимальной клеточной линии является критическим фактором для проведения успешных исследований вирусов. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что использование клеточных линий явля-

ются предпочтительными моделями для дальнейших исследований вируса АЧС, обеспечивая высокую эффективность репликации и открывая широкие возможности для изучения этого важного патогена.

Библиографический список

1. Tulman, E. R. African Swine Fever Virus. In Lesser Known Large dsDNA Viruses / G.A. Delhon, B.K. Ku, D.L. Rock, V. Ed. Etten // Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; Volume 328, pp. 43–87.
2. Masujin, K. An immortalized porcine macrophage cell line competent for the isolation of African swine fever virus / K. Masujin, T. Kitamura, K.-I. Kameyama, K. Okadera, T. Nishi, T. Takenouchi, H. Kitani, T. Kokuho // Sci. Rep. 2021, 11, 4759.
3. Franzoni, G. / Infection, modulation and responses of antigen-presenting cells to African swine fever viruses/ G. Franzoni, S.D. Giudici, A. Oggiano // Virus Res. 2018, 258, 73–80.
4. Малоголовкин, А. А. / Вирус африканской чумы свиней CD2v и локусы гена лектина С-типа опосредуют серологическую специфичность/ А.А. Малоголовкин, Г.С. Бурмакина, Э.Р. Тулман, Г. Делон, Д.Г. Диль, Н. Сальников, Г.Ф. Кутиш, Д.В. Колбасов, Д.Л. Рок // J. Gen. Вирол. 2015, 96, 866-873.
5. Бурмакина, Г.С. / Серотипоспецифичные белки вируса африканской чумы свиней являются важными защитными антигенами при африканской чуме свиней/ Г. С. Бурмакина, А. А. Малоголовкин, Э. Р. Тулман, Л. Зсак, Г. Делон, Д. Г. Диль, Н.М. Шобогоров, Ю.П. Моргунов, С.Ю. Моргунов, Г. Ф. Кутиш [и др.] // J. Gen. Вирол. 2016, 97, 866-873.
6. Koltsova, G.S. Growth Kinetics and Protective Efficacy of Attenuated ASFV Strain Congo with Deletion of the EP402 Gene / G. Koltsova, A. Koltsov, S. Krutko, N. Kholod, E.R. Tulman, D. Kolbasov // Viruses. 2021 Jun 28;13(7):1259.

УДК 579.64

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И ИХ РОЛЬ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Логвинова Татьяна Ивановна, к.б.н., н.с., ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

***Аннотация.** В настоящее время актуальным направлением в животноводстве является изучение положительного воздействия на организм животных молочнокислых и пропионовокислых микроорганизмов, способных нормализовать функционирование микрофлоры желудочно-кишечного тракта. В этой связи перспективны исследования по выделению новых культур пропионовокислых микроорганизмов и изучению их ростовых, морфологических, пробиотических свойств.*