

Г.Н. Величко ✉

Т.В. Гальнбек

Федеральный научный центр —
Всероссийский научно-
исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии
им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко
Российской академии наук, Москва,
Россия

✉ galina.velichko.68@mail.ru

Поступила в редакцию:
16.08.2023

Одобрена после рецензирования:
15.09.2023

Принята к публикации:
29.09.2023

Galina N. Velichko ✉

Tatyana V. Galnbek

Federal Scientific Center —
All-Russian Research Institute of
Experimental Veterinary Medicine named
after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko
of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

✉ galina.velichko.68@mail.ru

Received by the editorial office:
16.08.2023

Accepted in revised:
15.09.2023

Accepted for publication:
29.09.2023

Чувствительность культур клеток к парвовирусу гусей

РЕЗЮМЕ

Вирусный энтерит гусей является одной из наиболее значимых болезней водоплавающих птиц. Это заболевание вызывает высокую летальность молодняка гусей 16,3–99,6 % и наносит значительный экономический ущерб отрасли. Инфекция широко распространена в различных регионах России. Работа с культурой клеток является неотъемлемой частью лабораторной диагностики парвовирусного энтерита гусей. Для выделения вируса, изучения биологических свойств, накопления возбудителя используют развивающиеся эмбрионы гусей и культуры клеток из органов и тканей эмбрионов гусей. Но получение этих культур связано с сезонностью яйцекладки у данного вида птиц. Информация о культивировании парвовируса гусей на других культурах весьма ограничена. Необходимость проведения более широких исследований для определения спектра чувствительных культур клеток, пригодных для репродукции вируса независимо от сезона, является актуальной научной проблемой. Для культивирования многих вирусов успешно применяют культуры клеток гетерологичного видового происхождения. В связи с этим была изучена возможность репродукции парвовируса гусей в культурах клеток разного тканевого и видового происхождения: крупного рогатого скота (КРС), свиней, коз, овец, обезьян, кошек, гусей и гибридных культур. Было установлено, что гетерологичные культуры клеток не поддерживают репродукцию парвовируса гусей. Более того, полученная авторами гибридная культура «С х Г» (свинья и гусь) также не проявляла чувствительности к вирусу.

Ключевые слова: парвовирус гусей, культура клеток, цитопатическое действие, полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для цитирования: Величко Г.Н., Гальнбек Т.В. Чувствительность культур клеток к парвовирусу гусей. *Аграрная наука*. 2023; 375(10): 38–41. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-375-10-38-41>

© Величко Г.Н., Гальнбек Т.В.

Sensitivity of cell cultures to goose parvovirus

ABSTRACT

Virus enteritis of geese is one of the most important diseases of waterfowl. This disease causes high lethality in young goslings — up to 16,3–99,6% and significant economic damage to the industry. The infection is widespread in various regions of Russia. It is known that cell culture is an integral part of the laboratory diagnosis of goose parvovirus enteritis. For virus isolation, studying its biological properties, and its accumulation, cell cultures from the organs and tissues of goose embryos and their embryos are widely used. However, the cell cultures' derivation from goose embryos depends on the seasonality of oviposition in this species of bird. Information on the cultivation of goose parvovirus in other species of cell culture is very limited. To determine the range of cell cultures suitable for virus replication, regardless of the season, is an urgent scientific problem that demands more extensive research. Cell cultures of heterologous species are successfully used for the cultivation of many viruses. In this regard, we studied the possibility of reproduction of the geese parvovirus in cell cultures of different tissues and species of origin: cattle, pigs, goats, sheep, monkeys, cats, geese, and hybrid cultures. It was found that heterologous cell cultures do not support goose parvovirus replication. Moreover, the pig-geese hybrid culture derived by the authors did not show sensitivity to the virus.

Key words: goose parvovirus, cell cultures, cytopathic effect, polymerase chain reaction (PCR)

For citation: Velichko G.N., Galnbek T.V. Sensitivity of cell cultures to goose parvovirus. *Agrarian science*. 2023; 375(10): 38–41 (In Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-375-10-38-41>

© Velichko G.N., Galnbek T.V.

Введение/Introduction

Вирусный энтерит гусей — контагиозная болезнь с высокой летальностью молодняка гусей, достигающей 16,3–99,6%. Возбудителем является *Parvovirus* рода *Dependovirus* подсемейства *Parvoviridae* семейства *Parvovirinae*. К этому возбудителю чувствительны гуси, мускусные и пекинские утки. Данное заболевание регистрируют в Китае, Венгрии, Турции, России и других странах [1–10].

Характерное свойство данного возбудителя — крайне узкий спектр хозяев. Для выделения и культивирования возбудителя используют развивающиеся эмбрионы гусей и культуры клеток из органов и тканей эмбрионов гусей [11–13]. Чувствительность к парвовирусу гусей также обнаружена у культур фибробластов эмбрионов мускусных уток [14]. Для культивирования многих вирусов применяют культуры клеток гетерологичного происхождения [15]. Попытки культивирования парвовируса на гетерологичных культурах до настоящего времени не увенчались успехом, однако следует отметить, что эти исследования носили ограниченный характер. Изучение чувствительности к парвовирусу гусей перевиваемой культуры подкожной соединительной ткани мыши (L) и перевиваемой культуры клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) также не выявило репродукции вируса [16]. Сообщений о более широких исследованиях в доступной литературе не обнаружено. Первично-трипсинизированная культура фибробластов эмбриона гусей остается наиболее распространенной моделью для культивирования возбудителя.

Однако получение этой культуры клеток связано с сезонностью яйцекладки гусей. В связи с этим возникла необходимость проведения более широких исследований для определения спектра культур клеток, пригодных для репродукции вируса.

Проведенный анализ обобщает результаты данных исследований изучения чувствительности культур клеток различного видового и тканевого происхождения к парвовирусу гусей.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

Работа выполнена в 2022 году в лаборатории вирусологии и в отделе клеточной биотехнологии и питательных сред со специализированной коллекцией сельскохозяйственных и промысловых животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (г. Москва, Россия)..

Для выполнения работы использовали перевиваемые (постоянные) культуры клеток различного видового и тканевого происхождения из Российской коллекции культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных ВИЭВ, таких как: почка теленка (МДБК, ПТ-80), легкое плода коров (ЛПК, ЛЭК), тестикулы эмбриона бычка (ТЭБ), тестикулы поросенка (ПТП), почка эмбриона свиньи (СПЭВ), почка свиньи (ПК-15); почка кошки (ПК-91), селезенка кошки (FS); почка кролика (РК-13), две клеточные линии почки зеленой мартышки (Vero), тестикулы козленка (Т-коз ВИЭВ), тестикулы ягненка (ТЯ), яичники овцы (ЯО), фибробласты мыши (Л-929), в том

числе — первичную культуру клеток почки, селезенки, фибробластов эмбрионов гусей¹. Также исследовали чувствительность гибридной линии клеток свиньи и гуся СхГ.

Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили из кожно-мышечных тканей 12–13-дневных гусиных эмбрионов. Выделение клеток проводили с использованием 0,25%-ного раствора трипсина. Для культивирования клеток использовали смесь среды 199 и гидролизата лактальбумина с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. Клеточную культуру выращивали в термостате при 37 °С.

Все вышеуказанные культуры клеток заражали парвовирусом гусей в дозе 0,1 ТЦД₅₀/клетку. Данная доза вызывала полноценную репродукцию вируса в чувствительной культуре клеток и была выбрана для сравнительной оценки чувствительности испытываемых культур.

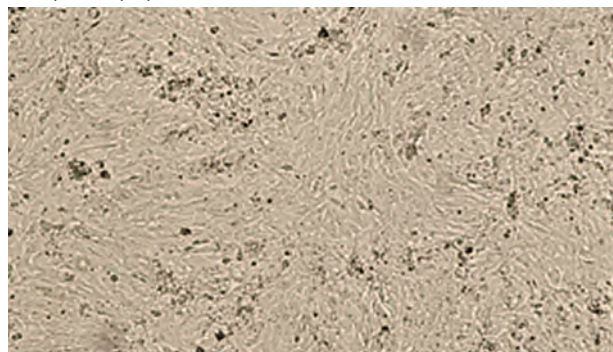
Репродукцию вируса регистрировали по наличию цитопатического действия, а также в полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК выделяли с помощью набора реактивов производства компании «ВЕТ ФАКТОР» (Россия). ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием тест-системы для амплификации ДНК Goose parvovirus (GPV) GenPak DNA-Fluo PCR test («Изоген», Россия) в термоциклере LightCycler 96 (Roche, Швейцария).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Работа с клеточными культурами является неотъемлемой частью лабораторной диагностики парвовирусного энтерита гусей. Культуры клеток фибробластов эмбрионов гусей традиционно используются для выделения возбудителя из патологического материала, изучения биологических свойств, накопления препаративных количеств возбудителя. Культура фибробластов эмбрионов гусей была использована в качестве эталонной культуры. Первично-трипсинизированные культуры клеток формировали конфлуэнтный монослой через 24 часа после посева при посевной концентрации 400–500 тыс. кл/мл. Монослой такой культуры был морфологически неоднородным с преобладанием фибробластоподобных клеток. При инфицировании культуры клеток парвовирусом штаммом G-8 цитопатическое действие (ЦПД) проявлялось в виде зернистости цитоплазмы на третьи сутки культивирования. В дальнейшем клетки округлялись и отслаивались от стекла с образованием пустот. Полное отторжение клеток от стекла наступало на пятые–шестые сутки (рис. 1–4).

Рис. 1. Неинфицированная культура клеток фибробластов эмбрионов гусей через 24 часа после засева. Неокрашенный препарат. Увел. 40X

Fig.1. Culture of goose embryo fibroblasts 24 h days after sowing. Unpainted preparation. Increase 40



¹ Гулюкин М.И., Дьяконов Л.П., Какпаков В.Т., Гальбек Т.В., Акиншина Г.Т., Киселева Д.Р., Завьялова Е.А. Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных, 3-е изд. Москва. 2011; 155

Рис. 2. Культура клеток фибробластов эмбрионов гусей, зараженная парвовирусом, штамм G-8, через 4 сут. Увел. 40X

Fig. 2. Fibroblast culture of goose embryos infected parvovirus st. G-8, 4 days. Unpainted preparation. Increase 40

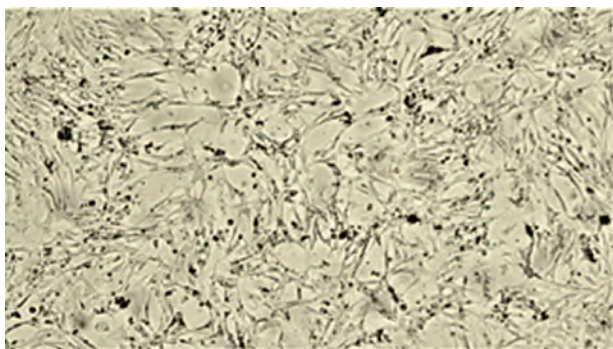
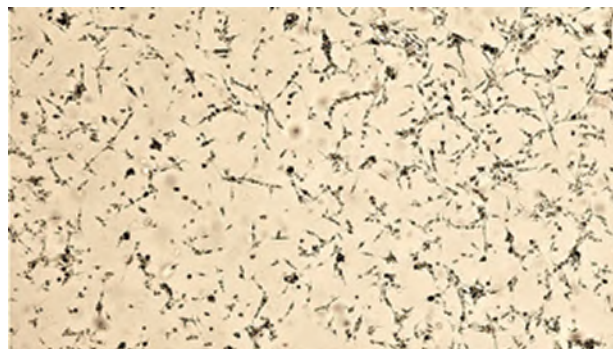


Рис. 3. Культура клеток фибробластов эмбрионов гусей, зараженная парвовирусом, штамм G-8, через 5 сут. Увел. 40X

Fig. 3. Fibroblast culture of goose embryos infected parvovirus st. G-8, 5 days. Unpainted preparation. Increase 40



Накопление вируса в эти сроки достигало максимальных значений: титр составлял 4,5 Ig ТЦД₅₀/мл. В ПЦР геном вируса выявляли в разведении до 10⁵. Первично-трипсинизированные культуры клеток почек, селезенки эмбрионов гусей обладали аналогичной чувствительностью. Последовательные пассажы вируса в этих культурах (до 5) не приводили к снижению уровня накопления, изменения картины ЦПД и результатов ПЦР.

В культурах клеток КРС постоянных линий и первичных культур, репродукции вируса не отмечено. Слепые пассажы не привели к адаптации вируса. Исключением была культура клеток MDBK, в которой наблюдали образование локальных фокусов округлившихся клеток. По мере культивирования эти клетки формировали цитоагломераты. На протяжении всего срока наблюдения — 7–10 суток — дальнейшего развития изменений не происходило. Титр вируса был менее 1 Ig. Геном вируса выявляли только в нативной культуральной жидкости.

Культуры клеток свиней ПТП, СПЭВ, ПК–15 не поддерживали репродукции данного вируса. Гибридная линия клеток С х Г не поддерживала репродукции парвовируса гусей. Однако полученная гибридная линия клеток С х Г оказалась чувствительной к широкому

спектру ДНК-, РНК-вирусам различного видового происхождения, за исключением парвовируса гусей.

Парвовирус гусей не размножался в культуре фибробластов мышей Л-929: морфологических изменений клеток не происходило на протяжении всего срока наблюдения (10–12 дней). ПЦР показала отрицательный результат.

Репродукции вируса в культурах клеток почки кошки, зеленой мартышки, кролика, коз, овец также не установлено, о чем свидетельствовали отсутствие ЦПД и отрицательные результаты ПЦР.

Выводы/Conclusion

Изучение чувствительности культур клеток различного видового и тканевого происхождения к парвовирусу гусей продемонстрировало, что полноценную репродукцию вируса поддерживают исключительно культуры клеток гусей. Эта особенность видоспецифичности вируса находится в прямой зависимости с его способностью вызывать заболевание у гусей. Гибридная линия клеток С х Г, несмотря на наличие генетического материала гусей, не проявляла чувствительности к вирусу. Можно сделать предположение об отсутствии специфических рецепторов на поверхностной клеточной мембране.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в работу.

Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ:

Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и образования Российской Федерации (FGUG-2022-0009).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ning K., Wang M., Qu S., Lv J., Yang L., Zhang D. Pathogenicity of Pekin duck- and goose-origin parvoviruses in Pekin. *Veterinary Microbiology*. 2017; 210: 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.020>
2. Wang K., Wang C.J., Pan L., Wang G.J., Qi K.Z., Liu H.M. Isolation and characterization of a goose parvovirus from Yan goose. *Acta virologica*. 2016; 60(3): 333–335. https://doi.org/10.4149/av_2016_03_333
3. Kardog n  ., M stak H.K., M stak  .B. The first detection and characterization of goose parvovirus (GPV) in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*. 2021; 53: 36. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02463-8>
4. Isidan H., Turan T., Atasoy M.O., Coskun A. Molecular analysis of goose parvovirus field strains from a Derzsy's disease outbreak reveals local European-associated variants. *Archives of Virology*. 2021. 166(7): 1931–1942. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05086-y>
5. Li P. et al. Isolation and characterization of novel goose parvovirus-related virus reveal the evolution of waterfowl parvovirus. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018; 65(2): e284–e295. <https://doi.org/10.1111/tbed.12751>

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

FUNDING:

The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation (FGUG-2022-0009).

REFERENCES

1. Ning K., Wang M., Qu S., Lv J., Yang L., Zhang D. Pathogenicity of Pekin duck- and goose-origin parvoviruses in Pekin. *Veterinary Microbiology*. 2017; 210: 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.020>
2. Wang K., Wang C.J., Pan L., Wang G.J., Qi K.Z., Liu H.M. Isolation and characterization of a goose parvovirus from Yan goose. *Acta virologica*. 2016; 60(3): 333–335. https://doi.org/10.4149/av_2016_03_333
3. Kardog n  ., M stak H.K., M stak  .B. The first detection and characterization of goose parvovirus (GPV) in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*. 2021; 53: 36. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02463-8>
4. Isidan H., Turan T., Atasoy M.O., Coskun A. Molecular analysis of goose parvovirus field strains from a Derzsy's disease outbreak reveals local European-associated variants. *Archives of Virology*. 2021. 166(7): 1931–1942. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05086-y>
5. Li P. et al. Isolation and characterization of novel goose parvovirus-related virus reveal the evolution of waterfowl parvovirus. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018; 65(2): e284–e295. <https://doi.org/10.1111/tbed.12751>

6. JinLong Y. *et al.* A simple and rapid method for detection of Goose Parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*. 2010. 7: 14. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-14>
7. Li P. *et al.* Development of a duplex semi-nested PCR assay for detection of classical goose parvovirus and novel goose parvovirus-related virus in sink or dead ducks with short beak and dwarfism syndrome. *Journal of Virological Methods*. 2017; 249: 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.011>
8. Bian G. *et al.* Identification and genomic analysis of two novel duck-origin GPV-related parvovirus in China. *BMC Veterinary Research*. 2019; 15: 88. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1833-9>
9. Li D., Zhang L., Chen S., Gu J., Ding M., Li J. Detection and Molecular Characterization of Two Genotypes of Goose Parvoviruses Isolated from Growing Period Geese and Cherry Valley Ducks in China. *Avian Diseases*. 2019; 63(3): 411–419. <https://doi.org/10.1637/12015-121818-Reg.1>
10. Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Явдошак Л.И. Парвовирусная инфекция гусей. Санкт-Петербург; Ломоносов: Агат. 2013; 79. ISBN 978-5-86983-522-2 <https://www.elibrary.ru/tqeqpj>
11. Gough R.E., Spackman D., Collins M.S. Isolation and characterisation of a parvovirus from goslings. *The Veterinary record*. 1981; 108(18): 399–400. <https://doi.org/10.1136/vr.108.18.399>
12. Контримавичус Л.М. История изучения парвовирусной инфекции гусей в России. *Ветеринария*. 2011; (3): 61, 62. <https://www.elibrary.ru/ndjuvn>
13. Kisary J., Derzsy D. Viral disease of Goslings. IV. Characterization of the causal agent in tissue culture system. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1974; 24(3): 287–292.
14. Величко Г.Н. Биологические свойства парвовируса гусей. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(S1): 56, 57. <https://www.elibrary.ru/yjgbmr>
15. Калинин А.Г., Гальнбек Т.В., Кулешов К.В., Сотников А.Н., Володько Д.В., Потапова И.В. Скрининг чувствительности культур клеток к вирусу мешотчатого расплода пчел. *Ветеринария и кормление*. 2019; (2): 47–49. <https://doi.org/10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-2-17>
16. Петелина Е.А. Биологические и физико-химические свойства вируса энтерита гусей. Дисс. канд. биол. наук. Москва. 1984; 155.
6. JinLong Y. *et al.* A simple and rapid method for detection of Goose Parvovirus in the field by loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*. 2010. 7: 14. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-14>
7. Li P. *et al.* Development of a duplex semi-nested PCR assay for detection of classical goose parvovirus and novel goose parvovirus-related virus in sink or dead ducks with short beak and dwarfism syndrome. *Journal of Virological Methods*. 2017; 249: 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.011>
8. Bian G. *et al.* Identification and genomic analysis of two novel duck-origin GPV-related parvovirus in China. *BMC Veterinary Research*. 2019; 15: 88. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1833-9>
9. Li D., Zhang L., Chen S., Gu J., Ding M., Li J. Detection and Molecular Characterization of Two Genotypes of Goose Parvoviruses Isolated from Growing Period Geese and Cherry Valley Ducks in China. *Avian Diseases*. 2019; 63(3): 411–419. <https://doi.org/10.1637/12015-121818-Reg.1>
10. Trefilov B.B., Nikitina N.V., Yavdoshak L.I. Parvovirus infection of geese. St. Petersburg; Lomonosov: Agat. 2013; 79 (In Russian). ISBN 978-5-86983-522-2 <https://www.elibrary.ru/tqeqpj>
11. Gough R.E., Spackman D., Collins M.S. Isolation and characterisation of a parvovirus from goslings. *The Veterinary record*. 1981; 108(18): 399–400. <https://doi.org/10.1136/vr.108.18.399>
12. Kontrimavichus L.M. History of studying parvovirus infections of geese in Russia. *Veterinary Medicine*. 2011; (3): 61, 62 (In Russian). <https://www.elibrary.ru/ndjuvn>
13. Kisary J., Derzsy D. Viral disease of Goslings. IV. Characterization of the causal agent in tissue culture system. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1974; 24(3): 287–292.
14. Velichko G.N. Biological properties of goose parvovirus. *Infectious Diseases*. 2017; 15(S1): 56, 57 (In Russian). <https://www.elibrary.ru/yjgbmr>
15. Kalinin A.G., Galnbek T.V., Kuleshov K.V., Sotnikov A.N., Volodko D.V., Potapova I.V. Screening of sensitivity of cell cultures to the sacbroodvirus of bees. *Veterinaria i kormlenie*. 2019; (2): 47–49 (In Russian). <https://doi.org/10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-2-17>
16. Petelina E.A. Biological and physicochemical properties of goose enteritis virus. Diss. candidate biol. Sci. Moscow. 1984; 155.

ОБ АВТОРАХ

Галина Николаевна Величко,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
galina.velichko.68@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0003-2915-222X>

Татьяна Валерьевна Гальнбек,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
tatyana-galnbek@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0001-7753-5263>

Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук, Рязанский пр-т, 24, Москва, 109428, Россия

ABOUT THE AUTHORS

Galina Nikolaevna Velichko,
Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
galina.velichko.68@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0003-2915-222X>

Tatyana Valerievna Galnbek,
Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
tatyana-galnbek@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0001-7753-5263>

Federal Scientific Center — All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko Russian Academy of Sciences, 24 Ryazan Ave., Moscow, 109428, Russia