

PROPAGATION OF AVIAN POX VIRUS VACCINE STRAINS IN DUCK EMBRYO CELL CULTURES

Ivan Ivanov¹, Anton Kril¹, Konstantin Simeonov¹, Theodora Popova², Iskra Sainova¹, Yanko Tzvetkov³

¹ Institute of Experimental Pathology and Parasitology, BAS, Sofia, Bulgaria

² Forest Technical University, Faculty of Veterinary Medicine, Sofia, Bulgaria

³ Central Laboratory of Game Biology and Pathology, Sofia, Bulgaria

ОДГЛЕДУВАЊЕ НА СОЕВИ НА ВИРУСИ НА ПТИЧЈА ДИФТЕРИЈА ЗА ВАКЦИНИ ВО ЕМБРИОНАЛНИ КЛЕТОЧНИ КУЛТУРИ ОД ПАТКА

Иван Иванов¹, Анџон Крил¹, Константин Симеонов¹, Теодора Попова², Искра Саинова¹, Санко Цветков³

¹ Институтот за експериментална патологија и паразитологија, БАС, Софија, Буџарија

² Шумарски универзитет, Ветеринарен факултет, Софија, Буџарија

³ Централна лабораторија за биологија и патологија на дивечот, Софија, Буџарија

ABSTRACT

The susceptibility of primary duck embryo cell cultures and a permanent duck cell line DEC 99 to infection with embryo-adapted avian pox virus vaccine strains has been studied. The FK and Dessau strains of fowl and pigeon origin, respectively have been used. The virus strains were consecutively passaged (13 passages) on duck embryo primary cell cultures. The adapted virus strains have been further passaged (10 passages) in the permanent duck embryo cell line DEC 99, where a typical cytopathic effect (CPE) was observed. The production of infectious virions in both experiments was checked by inoculation of 11 day-old White Leghorn embryos, where typical pox proliferations on the chorioallantoic membranes were formed. In the DEC 99 cells the FK strain reached a titer of 10^7 PFU/ml, together with an earlier CPE appearance. The DEC 99-adapted virus strains induced typical cutaneous "takes" after vaccination of two month-old chicks. Thus, the DEC 99, as a standard cell culture system appears to be suitable for production of vaccines against fowl pox.

Key words: Embryo cells, Cell cultures, Cell lines, Endogenous retroviruses, Avian pox virus strains.

INTRODUCTION

The biological products for prevention of avian viral infectious diseases are generally obtained after inoculation of avian embryos or avian primary cell cultures. In case, when embryos for this production

КРАТКА СОДРЖИНА

Беше проучувана подложноста на примарните ембрионални клеточни култури од патка и постојаната клеточна линија на патка ЕКП 99 на инфекција со ембрионално адаптирани видови вируси на птичја дифтерија за вакцина. Беа употребени видовите ФК и Десау кои се со потекло од живина (ФК) и гулаби (Десау). Видовите вируси беа повеќекратно преминувани (13 премини) на ембрионални примарни клеточни култури на патка. Адаптираните видови вирус потоа беа понатамошно преминувани (10) во постојаната клеточна линија на патка DEC 99 каде што се следеше типичниот цитопатоген ефект (ЦПЕ). Производството на инфективните вириони во двата експерименти беше проверен со вакцинација на White Leghorn ембриони стари 11 денови, каде што се формираше типично размножување на сипаницата на хориоалантоисната мембрана. Во ЕКП 99 клетките, видот ФК достигна титар од 10^7 PFU/ml, заедно со претходна појава на ЦПЕ. Видовите вирус прилагодени на ЕКП 99 предизвикаа типични кожни промени после вакцинацијата на двомесечните пилиња. Според тоа, ЕКП 99 како стандарден систем на клеточна култура се чини дека е погоден за производство на вакцини против дифтерија кај живината.

Клучни зборови: ембрионални клетки, клеточни култури, ендогени ретровируси, видови на вируси на птичја дифтерија.

originate from poultry-farms, which are not specific pathogen free (SPF - farms) a certain risk of spreading viruses, bacteria, mycoplasmas and other vertically transmitted pathogens exists (Weiss, 1998).

The homologous cell culture systems used for propagation of avian viruses are in many instances inappropriate because of the presence of endogenous retroviruses (Ando, Toyochima, 1976; Robinson, 1978; Payne et al., 1992; Weiss, 1998). A better approach could be the use of cell cultures (CCs) from embryos of birds, where by means of hybridization techniques endogenous retroviral sequences have not been established (Shoyab, Baluda, 1975; Tereba et al., 1975; Payne, Purchase, 1991; Weissmahr et al., 1997), as are the aquatic birds, the Guinea fowl and the Japanese quail (Payne, Purchase, 1991; Smith et al., 1999). Moreover, the aquatic birds are more resistant to infection with *Mycoplasma gallisepticum*, compared to the other avian species (Gelenczei, Lasher, 1967).

The permanent cell lines (CLs) are generally accepted as standard and relatively stable systems applied in cell biology studies, virological investigations and in the biotechnology. Their advantages, when compared to primary cell cultures are the higher cellular yield (cell mass), maintenance in simple and cheap growth media with lower supplement quantity and their relatively stable phenotype.

Mayr and Kalcher (1960) reported for the first time about the successful cultivation of avian pox viruses (APVs) after adaptation passages in chicken and duck embryo cells. Later, Gelenczei & Lasher (1967) not only confirmed the possibility for replication of fowl, pigeon and turkey APVs in chicken and duck embryo cells, but also have prepared and tested the respective freeze-dried vaccines. In the literature available, no reports have been found about cultivation of APVs and production of vaccines against fowl pox in permanent cell lines from aquatic birds.

The present report describes the results from the studies on the adaptation and the consecutive cultivation of some vaccine avian pox virus strains in primary duck embryo CCs and in the permanent CL - DEC 99 (Ivanov, Kril, 2000).

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures. Primary and secondary CCs from Muscovy duck embryo cells were used. The cells have been obtained from 16 day-old embryos by conventional methods, immediately frozen and stored at -196 °C as a cell stock until use. CCs from the permanent CL DEC 99 were used after the 80-th passage.

Cultivation was performed in a CO₂ incubator (5% CO₂, 95% humidity) in a growth medium (GM): a combination of Medium 199 and Iskove's Modified Dulbecco's medium (IMDM), containing 25 mM HEPES

ВОВЕД

Биолошките продукти за спречување на птичјите вирусни инфективни болести општо се добиваат после вакцинацијата на птичјите ембриони или птичјите примарни клеточни култури. Во случај кога ембрионите за ова производство потекнуваат до живинарски фарми кои не се SPF, постои одреден ризик од ширење на вируси, бактерии, микоплазми и други вертикално преносливи патогени (Вајс, 1998).

Хомологните системи на клеточни култури употребени за размножување на птичјите вируси не се соодветни во многу случаи заради присуството на ендогени ретровируси (Андо, Тојочима, 1976; Робинсон, 1978, Пејн и други, 1992; Вајс, 1998). Употребата на клеточни култури (КК-и) од ембриони на птици може да претставува подобар пристап, во кои што со употребата на хибридациски техники не се формирале ендогени ретровирусни секвенци (Шојаб, Балуда, 1975; Тереба и други, 1975; Пејн, Пурчас, 1991; Вајсмар и други, 1997), како што се водните птици, бисерката и јапонската препелица (Пејн, Пурчас, 1991; Смит и други, 1999). Понатаму, водните птици се поотпорни на инфекција од *Mycoplasma gallisepticum* во споредба со другите видови птици (Геленчеј, Лашер, 1967).

Постојаните клеточни линии (КЛ-и) се општо прифатени како стандардни и релативно стабилни системи применети во проучувањата на клеточната биологија, виролошките испитувања и во биотехнологијата. Нивните предности во споредба со примарните клеточни култури се повисокиот клеточен принос (клеточна маса), одржување во едноставна и ефтина подлога за раст со пониско количество на додатоци и нивниот релативно стабилен фенотип.

Маир и Калхер (1960) известија за прв пат за успешната култивација на вирусите на птичјата дифтерија (ВПД) после адаптациони премини во ембрионалните клетки на пилињата и патките. Подоцна Геленчеј и Лашер (1967) не само што ја потврдија можноста за репликација на ВПД на живината, гулабите и мисирките во ембрионалните клетки на пилињата и патките, туку исто така ги подготвија и тестираа соодветните замрзнато-суви вакцини. Во достапната литература никаде не е споменато за култивација на ВПД и производство на вакцини против дифтерија кај живината во постојаните клеточни линии на водните птици.

Овој извештај ги опишува резултатите добиени од проучувањата на адаптацијата и последователната култивација на некои видови вируси на птичја дифтерија за вакцина во примарните ембри-

buffer (Sigma), supplemented with 5 per cent fetal bovine serum (FBS), (Sigma) and antibiotics in usual concentrations. The reconstituted embryo duck cells have been cultured to obtain a monolayer and after a passage were used for adaptation and cultivation of the virus strains.

Virus strains 1. Embryo-adapted vaccine strains of the Avian Pox virus - fowl strain (FK) with an infectious titer 10^3 EID₅₀/ml and pigeon's strain (Dessau) with an infectious titer $10^{2.5}$ EID₅₀/ml were used.

Inoculation of cell cultures. All cell cultures have been infected after 24 hours cultivation by semi-confluent monolayer formation with the reconstituted freeze-dried strains. The inocula have been filtered through 0.22 μ m Millipore filter units. Viruses were adsorbed for 1 hour at 37 °C by regular agitation and CCs were further maintained in growth medium, supplemented with 2% FBS.

Virus titrations. The infectivity of the virus strains was determined after inoculation on the chorioallantoic membrane of 11 day-old chicken embryos and inoculation of cell cultures.

11 day-old White Leghorn embryos, originating from our facilities were inoculated on the chorioallantoic membrane with 0.1 ml of the adapted on primary duck embryo CCs and cultivated on the CL DEC 99 FK and Dessau vaccine strains of APV. The incubation was performed for 6 days at 37 °C and after refrigeration for 24 hours at +4 °C the specific CAM lesions were determined.

Titrations have been performed on CCs from the DEC 99 cell line in 24-well plates (24 Nunclon, Space Saver Flow Lab) and the level of the specific cytopathic effect (CPE) has been determined 144 hours post inoculation (p.i.). The infectious titers were calculated according to Reed and Muench (1938).

Determinations of the immunogenicity of the cultured vaccine strains. The immunogenicity tests were performed on 20 two months old broiler chickens with an approximate body weight 1 kg, reared separately and without antibodies to fowl pox. Two groups of ten birds each were inoculated in the wing web with TCFs from the eight passage of the FK and the Dessau strains, cultured on the DEC 99 cell line, with infectious titers $10^{6.25}$ CCID₅₀/ml и $10^{4.5}$ CCID₅₀/ml, respectively. The results, namely the development of "takes" at the site of the inoculation were checked after 8 days.

RESULTS AND DISCUSSION

Primary duck embryo monolayer cell cultures were used for adaptation of virus strains. After the first passage no CPE was observed. During the second one only unspecific cellular changes, such as syncytium formation and an elevation of pH of the culture medium were noted, whereas typical CPE (rounding, vacuolation and degeneration of cells) was found 96 - 120 hours p.i. (Table 1).

ојални КК-и и во постојаните КЛ- ЕКП 99 (Иванов, Крил, 2000).

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Клеточни култури. Беа употребени примарните и секундарните КК-и од ембрионални клетки на мошусна патка. Клетките беа земени од 16 денови стари ембриони со конвенционални методи, веднаш беа замрзнати и складирани на -196 °C како клеточна залиха до употребата. КК-и од трајните КЛ ЕКП 99 беа употребени после 80-иот премин.

Култивацијата беше извршена во CO₂ инкубатор (5% CO₂, 95% влажност) со медиум за раст (Р) : комбинација на Медиум 199 и Исковит Модифициран Дулбеков медиум (ИМД) кој содржи 25 mM HEPES пуфер (Сигма), со додаток на 5 процентен фетусен говедски серум (ФГС), (Сигма) и антибиотици во вообичаена концентрација. Реконституираните ембрионални клетки на патка беа култивирани за да се добие монослој и после една пасажа беа употребени за адаптација и култивирање на видовите вирус.

Видови вирус 1. Беа употребени видовите вирус на птичјата дифтерија за вакцина кои се ембрионално адаптирани - видот вирус за живина (ФК) со инфективен титар 10^3 EID₅₀/ml и видот вирус за гулаби (Десау) со инфективен титар $10^{2.5}$ EID₅₀/ml.

Инокулација на клеточните култури. Сите клеточни култури беа инфицирани по 24 часовна култивација со формирање на полусливен монослој со реконструираниите замрзнато-суви видови вирус. Инокулумите беа филтрирани преку 0.22 μ m Милипор филтерни единици. Вирусите беа апсорбирани еден час на 37 °C со редовна агитација и КК-и беа понатаму одржувани во медиум за раст со додаток на 2% ФГС.

Вирусни титрации. Инфективноста на видовите вирус беше одредена по инокулацијата врз хориоалантоисната мембрана на пилешките ембриони стари 11 дена и инокулацијата на клеточните култури.

W.L. ембриони стари 11 дена кои потекнуваат од нашите објекти беа инокуирани врз хориоалантоисната мембрана со 0.1 ml од адаптираните врз примарни ембрионални КК-и на патките и култивирани врз КЛ ЕКП 99 ФК и Десау видови на ВПС. Инкубацијата траеше 6 дена на 37 °C и после ладење 24 часа на +4 °C беа одредени специфичните лезии на ХАМ.

Титрациите беа извршени на КК-ите од ЕКП 99 клеточните линии на плочи со 24 базенчиња (24 Nunclon, Space Saver Flow Lab) и нивото на специфичниот цитопатоген ефект (ЦПЕ) беше одредено

The earliest CPE appearance was observed by the fowl strain 72 hours p.i. The same strain after 7 consecutive passages, induced complete destruction of the monolayer 168 hours p.i. (Table 1).

144 часа по инокулацијата (п.и.). Инфективните титри беа пресметани според Рид и Мунш (1938).

Одредување на имуногеноста на култивирани видови вируси за вакцина. Тестовите на иму-

Table 1. Cytopathic effect (CPE) and infectious titers of FK and Dessau avian pox virus strains, cultured in primary duck embryo cell cultures^a.

Virus strains	N passages	CPE, hours p.i.							Titer lg EID ₅₀ /ml
		24	48	72	96	120	144	168	
FK	1								NT
Dessau	1								NT
FK	4				+	+	2+	3+	2.5
Dessau	4						+	+	1.5
FK	7				+	2+	3+	4+	3.5
Dessau	7					+	+	2+	2.0
FK	10			+	2+	2+	3+	4+	4.0
Dessau	10					+	2+	3+	2.5
FK	13			+	2+	2+	3+	4+	4.5
Dessau	13					+	2+	3+	3.0

²

^a (+) - 25% CPE; (2+) - 50% CPE; (3+) - 75% CPE; (4+) - complete CPE; (-) - absence of CPE; NT - not tested.

The results presented in Table 1 indicate that the duck embryo cells are permissive for the replication of the vaccine APV strains FK and Dessau. The presence of the virus strains in the tissue culture fluid (TCF) from primary cell cultures was checked after inoculation of susceptible chicken embryos. The titration of TCF from the third virus passage in 11 day-old embryos has established virus replication, despite the absence of CPE (Table 1). The FK strain elevated its titer with 1 log₁₀ in comparison with the initial one at the 7-th passage, whereas by the Dessau strain no difference was noted. By passage advance of the FK strain a marked tendency for the shortening the time for the CPE appearance, combined with an increase of the CPE levels were observed. The Dessau strain showed lower CPE levels after the 6-th day p.i. Moreover, by passage advance both virus strains increased their infectious titers (Table 1). These results confirm the established by Gelenczei and Lasher slower CPE development in duck embryo cells. In contrast to their results, however, we have not found infectious titers higher than 10^{4.5} EID₅₀/ml by the FK and 10^{3.0} EID₅₀/ml by the Dessau strain.

The duck embryo cells adapted vaccine viral strains induced typical CPE at the first passage. In this cell culture system the peculiarities of both strains, regarding the time and the level of CPE appearance were

ногеност беа извршени на 20 двомесечни бројлери со приближна телесна маса од 1 кг, одгледувани одвоено и без антитела за дифтерија кај живината. Две групи од по 10 птици беа вакцинирани во крилниот набор со ТТК-и од осмиот премин на видовите ФК и Десау, култивирани на DEC 99 клеточни линии со инфективни титри 10^{6.25} CCID₅₀/ml и 10^{4.5} CCID₅₀/ml последователно. Резултатите, особено развојот на промените на местото на вакцинирањето беа проверени по 8 дена.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Примарните ембрионални монослојни клеточни култури на патките беа употребени за адаптација на видовите вируси. После првиот премин не беше забележан никаков ЦПЕ. За време на вториот премин беа забележани само неспецифични клеточни промени, како што се формирање на синцијум и покачување на рН на подлогата на културата, додека пак типичниот ЦПЕ (заокружување, вакуолизација и дегенерација на клетките) беше откриен 96-120 часа п.и. (Табела 1)

Резултатите дадени во Табела 1 укажуваат на тоа дека ембрионалните клетки на патките доз-

preserved. The FK strain developed typical CPE approximately 48 hours earlier, compared to the Dessau strain. In addition, higher CPE levels were regularly observed by

волуваат репликација на видовите ФК и Десау на ВПД за вакцина. Присуството на видовите вирус во течноста на ткивната култура (ТТК) од примар-

Table 2. Cytopathic effect (CPE) and infectious titers of FK and Dessau avian pox virus strains after cultivation in permanent cell line DEC 99^a.

Virus strains	N passages	CPE, hours p.i.							Titer lg CCID ₅₀ /ml
		24	48	72	96	120	144	168	
FK	1		+	2+	3+	4+	4+	4+	3.5
Dessau	1					+	2+	2+	2.5
FK	3		+	2+	3+	4+	4+	4+	4.5
Dessau	3					+	2+	3+	3.5
FK	6		2+	4+	4+	4+	4+	4+	6.0
Dessau	6			+	2+	3+	3+	4+	5.0
FK	8		2+	4+	4+	4+	4+	4+	6.25
Dessau	8			+	2+	3+	3+	4+	5.0

^a(+) - 25% CPE; (2+) - 50% CPE; (3+) - 75% CPE; (4+) - complete CPE; (-) - absence of CPE.

the fowl strain. By passage advance both virus strains clearly increased their infectious titers (Table 2).

The wing web inoculation of experimental birds indicated that the FK (DEC 99) strain induced cutaneous lesions by 70% of them, while the Dessau (DEC 99) strain induced positive cutaneous reaction by 60% of the recipients. These results indicate that the DEC 99-cultured APVs are immunogenic.

The permanent cell line DEC 99 is permissive for the replication of the vaccine APV strains FK and Dessau and could be used for the production of the respective vaccines, since these strains replicate to the sufficient titers (Gelenczei, Lasher, 1967).

ните клеточни култури беше проверено после инокулацијата на подложните пилешки ембриони. Титрацијата на ТТК од третиот вирусен премин во ембрионите стари 11 дена ја утврди репликацијата на вирусите и покрај отсуството на ЦПЕ (Табела 1). Видот ФК го покачи својот титар со 1 \log_{10} во споредба со првичниот на 7-иот премин, додека пак кај видот Десау не се забележи никаква промена. Со напредувањето на пасажите на видот ФК се забележа силна тенденција за скратување на времето на појава на ЦПЕ комбинирано со зголемување на нивоата на ЦПЕ. Видот Десау покажа пониски нивоа на ЦПЕ после 6-иот ден п.и. Понатаму, со напредување на пасажите и двата видови на вирус ги зголемија своите инфективни титри (Табела 1). Овие резултати го потврдуваат утврдениот побавен развој на ЦПЕ во ембрионалните клетки на патките од страна на Геленчеј и Лашер. Спротивно на нивните резултати, ние не измеривме повисоки инфективни титри од $10^{4.5}$ EID₅₀/ml на ФК и $10^{3.0}$ EID₅₀/ml на видот Десау.

Видовите на вируси за вакцина адаптирани за ембрионалните клетки на патките предизвикаа типичен ЦПЕ во првиот премин. Во овој систем на клеточна култура беа зачувани особеностите на двата вида во однос на времето и нивото на појавата на ЦПЕ. Сојот ФК разви типичен ЦПЕ приближно 48 часа порано од сојот Десау. Понатаму, повисоките нивоа на ЦПЕ беа редовно сле-

дени и од видот на вирус за живина. Преку напредувањето на пасажите и двата соја на вирус очигледно ги зголемија нивните инфективни титри (Табела 2).

Вакцинацијата на крилниот набор на експерименталните птици укажа дека сојот ФК (ЕКП 99) предизвика кожни лезии на 70% од нив, додека пак сојот Десау (ЕКП 99) предизвика позитив-

ни кожни реакции кај 60% од примателите. Овие резултати укажуваат дека ЕКП 99 култивираните ВПС-и се имуногени.

Постојаната клеточна линија ЕКП 99 дозволува репликација на соевите на ВПС ФК и Десау и може да се употреби за производство на соодветни вакцини, бидејќи овие соеви се реплицираат во доволни титри (Геленчеј, Лашер, 1967).

REFERENCES

1. Ando, T., K. Toyochima. Genetic control of chicken hepler factor in cells which lack natural group specific antigens of avian leukosis virus. *Virology*, 73, 1976, 512-527.
2. Ivanov, I., A. Kril. Establishment and characterization of a permanent duck embryo cell line. *Exp. Pathology & Parasitology*, 5, 2000, /in press/.
3. Gelenczei, E., H. Lasher. Comparative studies of cell culture-propagated avian pox viruses in chickens and turkeys. *Avian Diseases*, 12, 1, 1967, 142-151.
4. Mayr, A., K. Kalcher. Vergleichende Studien ueber die Zuechtung von Gefluegelpockenviren in der Zellkultur. *Arch. Gef. Virusforsch.*, 10, 1, 1960, 72-102.
5. Payne, L., H. Purchase. Leukosis Sarcoma group. In: *Diseases of Poultry*, ed. Calnek, 1991, 386-431.
6. Payne, L., K. Howes, A. Gillespie, L. Smith. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV(HPRS-103) in 12 avian species: support for new avian retrovirus envelope subgroup, designated J. *J. Gen. Virology*, 73, 1992, 2995.
7. Robinson, H. Inheritance and expression of chicken genes that are related to avian leukosis sarcoma virus genes. In: *Current Topics Microb. Immunol.*, 27, 1978, 1-36.
8. Shoyab, M., M. Baluda. Homology between avian oncornavirus RNAs and DNA from several avian species. *J. Virology*, 16, 1975, 1492-1502.
9. Smith, L., A. Toye, K. Howes, N. Bumstead, L. Payne, K. Venugopal. Novel endogenous retrovirus sequences in the chicken genom closely related to HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus. *J. Gen. Virology*, 80, 1999, 261.
10. Tereba, A., L. Skoog, P. Vogt. RNA tumor virus specific sequences in nuclear DNA of several avian species. *Virology*, 65, 1975, 524-534.
11. Weiss, R. ONg retroviral particles in chick cell grown vaccines. *J. Clin. Virology*, 11:1, 1998, 3-6.
12. Weissmahr, R., J. Schupbach, J. Boni. Reverse transcriptase activity in chicken embryo fibroblast culture supernatants is associated with particles containing endogenous avian retrovirus EAV-0 RNA. *J. Virology*, 71:4, 1997, 3005.