

14.00.36. Н.Ю. Алексеева. – М., 1997. – 48 с. 2. Захарова И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко. – Киев: Наукова думка, 1982. – С. 36-37. 3. Ляшенко, В.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В.А. Ляшенко, А.А. Воробьев. М.: Медицина, 1982. – 272 с. 4. Пак С. Г. Сальмонеллез / С.Г. Пак, М. Х. Турьянов, М. А.Пальцев // М.: Медицина, 1988. – 304 с. 5. Специфическая профилактика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных / Б.Ю. Шустер [и др.] // Ветеринария. – 1994. - № 2. – С. 11-14. 6. Шемельков, Е.В. Антигенная активность вакцины против инфекционных болезней свиней при включении в ее состав адьювантов / Е.В. Шемельков, Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 4— С. 58-63. 7. Мертвцов, Н.П. Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин / Н.П. Мертвцов. – Новосибирск, 1987. – 168 с. 8. Forgacs, A. Kontrollmethoden zur Standardisierung der Emulsionsimpfstoffe / A. Forgacs, T.Perenyi, F. Solyom // Phylaxia, Virushauptabteilung, Biochemische Abteilung. – Budapest. – 2001. – P. 46-52. 9. Lindblad, E.B. Aluminium adjuvants — in retrospect and prospect / E.B. Lindblad // Vaccine. – 2004. – Vol. 22. – P. 3658-3668. 10. Veterinary vaccinology / P.-P Pastoret [at al.]. – Elsevier. – 1997. - P. 131-153. 11. Алексеева, Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллезов и чумы на основе структурного объединения антигенов и синтетических полиэлектролитов: автореф. дис. ...докт. вет. наук: 14.00.36 / Н.Ю. Алексеева; Ин-т иммунологии. – Москва, 1997. – 48 с.

УДК 619:576.535:578.824.11

ОПТИМАЛЬНЫЕ РЕЖИМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИНИИ КЛЕТОК ВНК-21(с-13)

Бабак В.А., Ломако Ю.В., Гусев А.А., Чаплыго К.Э., Пунтус И.А., Филипова А.Е.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

В статье представлены результаты культивирования линии клеток ВНК-21(с-13) стационарным, роллерным, роллерно-суспензионным и истинно суспензионным методами. Приведены оптимальные параметры глубинного культивирования клеток в лабораторном биореакторе и пилотных аппаратах. Рассмотрены аспекты масштабирования процесса культивирования клеток.

In article there are the results of cultivation of cell line ВНК-21(с-13) by the stationary, roller, roller-suspension and by true suspension methods. Optimum parameters of deep cultivation of cells in the laboratory bioreactor and pilot devices are presented. Aspects of scaling of the process cells cultivation are considered.

Введение. Культивирование клеток и вирусов в биотехнологии при производстве живых и инактивированных вирусных вакцин проводится по методам стационарного, роллерного, суспензионного культивирования и на микроносителях [3, 4, 5].

Использование метода стационарного культивирования клеток ограничено большими затратами рабочего времени, материалов и реактивов, при этом урожай клеток лимитирован доступной для роста поверхностью культурального сосуда [4, 10, 12].

Роллерный метод культивирования позволяет получить значительно большие количества клеток по сравнению с традиционным стационарным методом. Он более экономичен, характеризуется оптимальным отношением полезной площади культивирования к объему питательной среды и открывает благоприятные возможности для накопления клеточной массы и получения более высокого выхода вирусного антигена (на 1,0–2,0 Ig в сравнении со стационарным). При этом методе возможны различные пути увеличения площади поверхности роллерных сосудов, на которой происходит прикрепление и размножение клеток [4, 5, 8, 9, 13].

Способность к росту и размножению в роллерных условиях обладают субкультуры, диплоидные и перевиваемые культуры, реже первичные линии. Для лучшего размножения клеток в роллерных аппаратах необходима первичная их адаптация к новым условиям культивирования.

Стационарный и роллерный методы культивирования относятся к непроточным монослойным двухмерным (2D) системам культивирования [7, 11, 13].

Очевидны некоторые преимущества монослойных культур: высокая плотность клеток в монослое; возможность полной замены питательной среды в процессе культивирования; наличие тесных межклеточных контактов, которые требуются для распространения вирусов; частичная контаминация отдельных сосудов не приводит к потере всей серии биоматериала. К недостаткам монослойных культур следует отнести: требование большой поверхности субстрата; высокая стоимость и трудоемкость при масштабировании, трудность отбора проб для контроля; неоднородность получаемого биоматериала; сложность контроля рН и концентрации кислорода.

Рост требований к количеству и качеству разрабатываемых вакцин способствовал усовершенствованию методов культивирования клеток. Принципиальный шаг в этом направлении сделан при разработке суспензионного и псевдосуспензионного методов культивирования.

В 1953 году Оуэнс с сотрудниками впервые показали способность клеток размножаться в жидкой среде в свободно суспендированном состоянии. С тех пор метод суспензионного глубинного культивирования привлекает внимание исследователей в связи с его высокой эффективностью по накоплению больших количеств биомассы клеток, необходимых для промышленного культивирования вирусов. Для суспензионного культивирования клеток во взвеси разработан аппарат «биореактор» для глубинного культивирования клеток и вирусов в питательной среде в условиях стерильности, интенсивного перемешивания, непрерывного продувания стерильным воздухом и постоянной температуры, рН и т.д. Метод суспензионного культивирования клеток и его модификации относятся к проточным истинно-суспензионным системам культивирования [4, 6, 7, 11, 13].

Van Wezel (1967) [14] предложил метод культивирования, сочетающий элементы монослойного и суспензионного выращивания клеток в биореакторах – метод микроносителей. Принцип метода в том, что клетки прикрепляются и размножаются на поверхности полимерных микроносителей, которые находятся во взвеси суспензии с помощью перемешивающего устройства либо зафиксированы в проточной колонке биореактора. Метод культивирования клеток с использованием микроносителей относится к проточным псевдосуспензионным монослойным трехмерным (3D) системам культивирования клеток [4, 11, 13].

В Республике Беларусь при культивировании клеток животных используются стационарный и роллерный однослойные методы выращивания. В связи с этим, целью наших исследований являлось определить оптимальные параметры культивирования клеток ВНК-21(с-13) суспензионным и модифицированным роллерно-суспензионным методом в сравнительном аспекте со стационарным и роллерным методами накопления клеток.

Материалы и методы. Для проведения исследований мы использовали суспензионную линию клеток ВНК-21(с-13) (почка сирийского хомячка), чувствительную к вирусу бешенства, вирусу болезни Ауески, вирусу ящура и некоторым другим. Общепринято работу с культурой клеток ВНК-21 проводить на синтетических питательных средах ЕМЕМ (ИглаМЕМ), ДМЕМ (ДюльбекаМЕМ) или ферментативном гидролизате мышечных белков (ФГМ-С), с добавлением 10% сыворотки крови КРС. В качестве компонентов обогащения модифицированных питательных сред использовали добавление глюкозы (до 4000 мг/л) и L-глутамина (300 мг/л). При работе с культурой клеток ВНК-21(с-13) использовались общепринятые методики трипсинизации клеток, их подсчета и посева с соблюдением правил работы в стерильных боксовых помещениях.

Стационарное культивирование клеток ВНК-21(с-13) проводили в матрасах РУ объемом 1,5л из нейтрального стекла, при этом посевная концентрация составила 5,0 млн.кл./матр, объем заполнения средой 150-180мл. В сравнительном опыте по стационарному культивированию использовали однослойную культуру клеток ВНК-21 (5,0 млн.кл./матр, 150 мл).

Роллерное культивирование проводили во флаконах объемом 2-4 литра из боросиликатного стекла, с посевной концентрацией клеток $15 \pm 1,0$ млн.кл./рол в 150-160 мл ростовой питательной среды (на 2-х литровый флакон). Инкубировали в термальной комнате при $+37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ со скоростью вращения роллеров 0,4–0,6 об/мин.

Модифицированное роллерно-суспензионное культивирование осуществляли в тех же роллерных флаконах объемом 2-4 литра на роллерной установке «Weaton».

Суспензионное культивирование клеток проводили в лабораторном биореакторе BioFlo110 с рабочим объемом до 5-ти литров, биореакторе Radlays с рабочим объемом до 25-ти литров и в пилотном биореакторе BioFlo 5000 с рабочим объемом до 60-ти литров при поддержании постоянной температуры $+37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ и интенсивном перемешивании механической мешалкой.

Критериями оценки результатов при роллерном и суспензионном методе культивирования являлись выход клеток и индекс пролиферации, жизнеспособность клеток и степень пролиферативной активности в следующем пассаже.

Методически процесс суспензионного культивирования в биореакторе осуществляли в следующих модификациях:

- периодический режим культивирования – без подачи дополнительных порций среды после посева культуры клеток ВНК-21(с-13), с одноразовой загрузкой и разгрузкой биореактора для накопления биомассы клеток;
- режим продленного периодического культивирования – с подпиткой культуры клеток ВНК-21(с-13) свежей питательной средой в соответствующем объеме (удлиненный процесс накопления биомассы) для увеличения биомассы клеток.

Результаты исследований и обсуждение. Для работы с культурой клеток ВНК-21(с-13) из широкого спектра синтетических и гидролизатных сред была подобрана ферментативная питательная среда ФГМ-С и синтетическая питательная среда ДМЕМ в соотношении 3:1 с добавлением 10% сыворотки КРС. Было установлено, что обогащение модифицированной питательной среды добавлением глюкозы (до 4000 мг/л) и глутамин (300 мг/л) позволило стабилизировать рост клеток и увеличить их выход лишь на 5–8%. Тем не менее, эти компоненты незаменимы для суспензионной культуры клеток ВНК-21(с-13), и могут стать лимитирующим фактором при продленном культивировании. Для гетерогенной асинхронной суспензионной клеточной культуры глюкоза и глутамин не являются компонентами индукции и синхронизации, поэтому могут быть использованы и дополнительно введены на любой фазе культивирования.

Стационарное культивирование клеток ВНК-21(с-13) показало, что формирование монослоя суспензионным клоном клеток происходит быстрее, чем однослойным (ВНК-21). После формирования монослоя к 48 часам часть клеток ВНК-21(с-13) начинало формировать обширные зоны роста сверху монослоя, часть клеток отторгалась в среду, где их размножение происходило не интенсивно (единичные клетки). Переросший монослой клеток не позволял просматривать морфологию клетки и затруднял дифференциальную работу при титрации вируса. Культура клеток ВНК-21 при той же посевной концентрации образовывала полный монослой к 72-96 часам, а наслоение клеток практически отсутствовало при культивировании 5-суточными циклами.

Индекс пролиферативной активности суспензионной линии ВНК-21(с-13) составил $16,0 \pm 1,5$, выход клеток – $81,0 \pm 9,5$ млн.кл./матр. ИГА однослойной линии ВНК-21 составил $10,0 \pm 2,2$ выход клеток – $55,0 \pm 10,6$ млн.кл./матр. При культивировании клеток **роллерным способом** использовали посевную концентрацию клеток $15 \pm 1,0$ млн.кл./рол. (2-х литровый) и 25-27 млн.кл./рол. (4-х литровый). Подобранный нами оптимальная питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ 3:1 показала стабильные результаты с высоким выходом клеток (таблица 1) [2].

Таблица 1 – Результаты исследования ростовых свойств клеток ВНК-21(с-13) при культивировании роллерным способом

Компоненты среды	Выход клеток с 2-х литр. роллера, ср.знач., млн.кл.	Выход клеток с 4-х литр.роллера, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
ДМЕМ*	$157,8 \pm 30,9$	$295,8 \pm 38,4$	11–15
ДМЕМ+ГЛА*	$161,6 \pm 46,6$	-	11,5–23,0
Игла МЕМ+ФГМ-С*	$226,6 \pm 78,4$	$380,55 \pm 72,0$	15–30
ФГМ-С	$143,3 \pm 27,0$	-	10–16
ФГМ-С+ГЛА	$228,3 \pm 65,3$	$405,8 \pm 45,5$	16,5–32,0
ФГМ-С+ДМЕМ	$290,0 \pm 36,40$	$535,0 \pm 65,3$	25–35

Как видно из таблицы 1, использование гидролизатной питательной среды ФГМ-С в различных модификациях позволяет увеличить средний выход клеток с роллера в 1,8–2,1 раза в сравнении с базовыми вариантами (ДМЕМ*, ДМЕМ+ГЛА* и ИглаМЕМ+ФГМ-С*).

При роллерном культивировании суспензионной линии клеток ВНК-21(с–13) некоторое их количество оставалось во взвешенном состоянии в культуральной питательной среде. В подобном варианте культуру клеток условно называют роллерно-суспензионной [1, 4, 12]. При подсчете таких неприкрепленных клеток отмечали их количество на уровне от 50 до 300 тыс.кл/мл в логарифмической фазе роста.

В сравнительном аспекте роллерное культивирование в 3,0–3,5 раза эффективнее стационарного при тех же затратах питательных сред и реактивов.

С целью увеличения выхода клеток ВНК-21(с–13) в суспензию при культивировании роллерным способом проведена серия экспериментов по модифицированному **роллерно-суспензионному культивированию** клеток. Для этого мы увеличили скорость вращения роллеров до 1,0–2,5 об/мин., довели объем питательной среды до 200 и 400 мл, при посевной концентрации клеток 100 тыс./мл, что стало основой двух опытных групп. При базовом варианте культивирования скорость вращения роллеров составляла 0,4–0,7 об/мин, объем питательной среды – 100 мл, посевная концентрация клеток – 100 тыс./мл. Контролем опыта служили роллеры с заполнением на 200 и 400 мл, скоростью вращения 0,4–0,7 об/мин и посевной концентрацией клеток 100 тыс./мл. Базовый вариант культивирования клеток стандартно используется при накоплении клеток ВНК-21(с–13) при проведении пассажей и для заправки в биореактор 5-ти литров суспензии клеток.

Установлено, что максимальный выход клеток отмечался в опытной группе №2 при объеме заполнения 400 мл и скорости вращения до 1,5–2,5 об/мин., который в 3–5 раз был выше, чем в базовом варианте культивирования, и в 1,35 раза больше, чем в идентичной контрольной группе, но со скоростью вращения роллеров 0,4–0,7 об/мин – таблица 2. Максимальное общее количество клеток в этой группе с монослоя и суспензии достигало 975–1210 млн.кл/рол, а в соответствующей контрольной группе №2 на 200–410 млн. клеток меньше.

Таблица 2 – Результаты культивирования клеток ВНК-21(с–13) роллерно-суспензионным и роллерным способом

Данные экспериментальных групп	Объем среды	Скорость вращения, об/мин	Выход клеток в монослое, млн.кл/рол	Выход клеток в суспензии, тыс.кл/мл*	Всего клеток в отношении к базовому варианту, %
Опытная №1	200 мл	1,0–2,5	160–280	720–980	140 и >
Контрольная №1	200 мл	0,4–0,7	150–250	550–800	120 и >
Опытная №2	400 мл	1,0–2,5	210–370	870–2100	270 и >
Контрольная №2	400 мл	0,4–0,7	180–320	600–1260	200 и >
Базовый вариант	100 мл	0,4–0,7	140–250	50–300	100

По данным изучения роста клеток ВНК-21(с–13) роллерно-суспензионным способом был определен оптимальный срок получения биомассы клеток в суспензии на пике логарифмического роста, который пришелся на 72 часа культивирования.

Индекс пролиферативной активности клеток ВНК-21(с–13), полученных роллерно-суспензионным способом, был высокий – 8,0–16,5, и сохранялся в последующих 2-3 пассажах при роллерном выращивании (срок наблюдения). Максимальное количество клеток полученных в пересчете с одного роллера (с монослоя и суспензии) достигало до 975–1210 млн.кл/рол.

Решающими факторами, которые стимулировали пролиферативную активность клеток при роллерно-суспензионном культивировании, стали обороты вращения роллеров, увеличение объема культуральной жидкости и корректировка концентрации клеток. Увеличение оборотов способствовало лучшему газообмену и преимущественному размножению клеток в культуральной среде (в суспензии). Дополнительное количество питательной среды, коррелирующее с увеличением посевной концентрации, также способствовали усиленному росту клеток во взвеси.

Данный метод культивирования позволяет сократить объем работ по накоплению клеток для заправки биореактора с 15–20 роллеров до 4–6, снижает расход питательных сред и реактивов, а также дополняет свежеприготовленную питательную среду культуральной жидкостью, полученной после выращивания гомологичных клеток, получая тем самым кондиционированную питательную среду.

Предложенный роллерно-суспензионный метод культивирования клеток ВНК-21(с–13) позволяет получить выход клеток минимум в 2,7 раза выше, чем в базовом варианте культивирования, и может быть использован для накопления биомассы клеток. Полученные роллерно-суспензионным способом клетки ВНК-21(с–13) были испытаны для загрузки биореактора для культивирования суспензионным способом.

Отработанные оптимальные результаты **суспензионного культивирования** клеток ВНК-21(с–13) в лабораторном и пилотных биореакторах приведены в таблице 3.

Выход клеток при таких параметрах через 48–72 часа культивирования составлял 2,0–2,8 млн.кл./мл суспензии. В отдельных экспериментах концентрация клеток ВНК-21(с–13) достигала 3,0–3,4 млн.кл./мл.

Кроме этого, при культивировании клеток учитывался показатель уровня пенообразования в биореакторе. Его необходимо рассматривать как фактор, влияющий на качество аэрации, процессы обмена между жидкой и газообразной фазой и, как травмирующий фактор. Уровень пены до одного см не оказывал влияния на ростовые свойства клеток. При более высоком уровне пены отмечали снижение ростовых свойств на 15–25%. Для устранения пенообразования использовали пеногаситель марки ПГ-108 в количестве 1–2 капли на 5 л клеточной суспензии.

Таблица 3 – Оптимальные параметры суспензионного культивирования клеток ВНК-21(с-13)

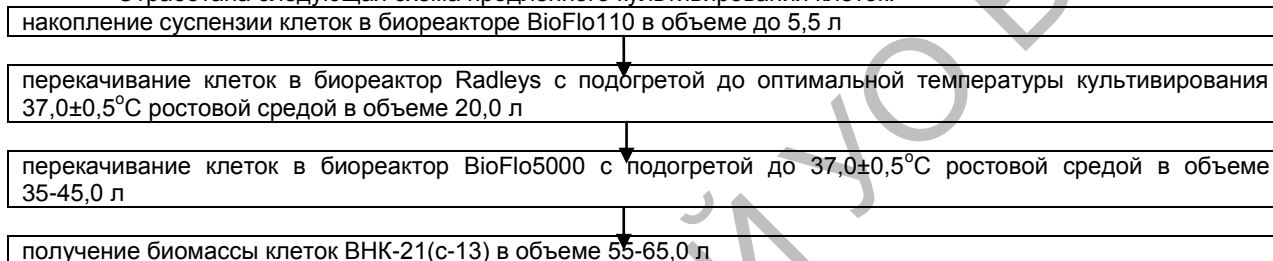
Параметры культивирования	BioFlo110	Radleys	BioFlo5000
температура культивирования, °С	37,0±0,2	37,0±0,5	37,0±0,5
pH клеточной суспензии, ед.	7,1±0,15	7,1±0,2	7,1±0,2
перемешивание, об/мин *	70-150	55-100	55-90
посевная концентрация, тыс.кл./мл.	450-700	500-700	500-700
расход воздуха, об/об среды *	1,0-3,0	0,5-2,0	0,5-2,0
DO ₂ , %	-	-	9-18
давление в биореакторе, атм.	-	0,1±10%	0,1-0,3
Тип используемой мешалки	лопастная двурядная	якорная	рамно-лопастная

* показатель приведен в зависимости от объема заполнения

Изучение параметров культивирования клеток, приведенное в таблице 3 проводилось по схеме периодического режима культивирования – без подачи дополнительных порций среды после внесения культуры клеток ВНК-21(с-13), с одноразовой загрузкой клеток в указанной концентрации и разгрузкой биореактора после получения максимального накопления клеток в логарифмической фазе.

При освоении методики крупномасштабного культивирования клеток был использован режим продленного периодического культивирования с подпиткой культуры клеток ВНК-21(с-13) свежей питательной средой в соответствующем объеме (удлиненный процесс накопления биомассы клеток).

Отработана следующая схема продленного культивирования клеток:



При «засеве» суспензии клеток ВНК-21(с-13) использовалась посевная концентрация в 450-700 тыс.кл./мл. При достижении в биореакторе BioFlo110 концентрации клеток уровня 1,8-2,4 млн.кл./мл (к 48-72 часам культивирования) перекачивали клетки в биореактор Radleys, разбавляя культуру клеток до концентрации 500-700 тыс.кл./мл, и продолжали цикл культивирования. Последующее перекачивание проводили в биореактор BioFlo5000, так же разбавляя культуру клеток до концентрации 500-700 тыс.кл./мл. Аэрацию осуществляли со 2-го часа после перезагрузки клеток в биореактор в количестве от 0,5 до 3-х объемов на объем заполнения.

Во всех модификациях суспензионного культивирования в биореакторе исследуемые клетки ВНК-21(с-13) оставались стерильными, доля жизнеспособных клеток составляла не менее 95%. Все параметры культивирования клеток суспензионным способом в биореакторе оценивались в пропорционально-интегральной взаимосвязи.

Выводы.

1. Стационарное культивирование клеток ВНК-21(с-13) показало его низкую эффективность в сравнении с роллерным (в 3-3,5 раза), как по выходу клеток, так и по качеству сформированного монослоя.

2. Изучен режим культивирования клеток ВНК-21(с-13) роллерным способом (посевная концентрация клеток – 100 тыс.кл./мл, скорость вращения флаконов – 0,4–0,6 об/мин, 5-суточные циклы роста), и возможность использования гидролизатных сред ФГМ-С и ГЛА: средний выход клеток с роллера отличался от базового варианта среды в 1,8–2,1 раза, при этом наиболее оптимальной была питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ (3:1).

3. Роллерно-суспензионный метод культивирования клеток ВНК-21(с-13) позволяет получить выход клеток минимум в 2,7 раза выше, чем в базовом варианте культивирования, и может быть использован для накопления биомассы клеток для заправки биореактора. Максимальное количество клеток полученных с одного роллера с монослоя и суспензии достигало до 975–1210 млн.кл./рол., культивируя клетки ВНК-21(с-13) по разработанной схеме: исходная концентрация клеток – 100 тыс.кл./мл; объем среды – 400 мл/рол; скорость вращения флаконов – 1,0–2,5 об/мин.

4. Определены оптимальные параметры суспензионного культивирования клеток ВНК-21(с-13) в биореакторе: температура +37,0±0,5°С; тип мешалки биореактора, влияющий на параметры и условия перемешивания; режим аэрации – 0,5–3,0 об/об. среды (DO₂ 9–18% кислорода), показатель концентрации водородных ионов среды (pH) – 6,9–7,3, посевная концентрация клеток – 450-700 тыс.кл./мл, и уровень пенообразования в биореакторе. Выход клеток при таких параметрах через 48–72 часа культивирования составлял 2,0–2,8 млн.кл./мл суспензии.

Литература. 1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с. 2. Бабак, В.А. Культивирование суспензионной линии клеток ВНК-21(с-13) / В.А. Бабак, К.Э. Чаплыго, Т.П. Кураш, А.А. Гусев // Журн. Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – Мн., 2009. – № 1. – С. 63–70. 3. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций. Мн.: БГУ, 2005. 4. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре / Л.П. Дьяконов, В.И. Ситьков. – М.: Компания Спутник+, 2000. – 400 с. 5. Культивирование клеток и тканей животных / Л.П. Дьяконов [и др.]; под общ. ред. Л.П. Дьяконова. – Ставрополь: Ставроп. Правда, 1988. – Ч. 2. – 91 с. 6. Культуры клеток и Биореакторы (часть 1)

[Электронный ресурс] – 2003. – Режим доступа : http://www.fermenter.ru/content/page_175_0.html?fermenter_u=51c15959eac2bef4501e16a004cdeb47. – Дата доступа : 28.06.2009.7. Культуры животных клеток // Культивирование клеток // Системы культивирования клеток [Электронный ресурс] / Основы биотехнологии. – 2006. – Режим доступа : <http://biotechnolog.ru>. – Дата доступа : 20.06.2009. 8. Репродукция культурального вируса бешенства при разных способах культивирования / Д.Ф. Осидзе [и др.] // Журн. Ветеринария. – 1990. – № 11. – С. 57. 9. Сафина, А.Н. Стационарное и роллерно-суспензионное культивирование межвидовой гибридной культуры клеток свинья х лошадь (а4х1) / А.Н. Сафина, Л.П. Дьяконов, Т.В. Гальбек. – Жур. Успехи современного естествознания. – 2004. – № 3. – С. 65–66. 10. Фрешни, Р. Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни. – М. : Мир, 1989. – 318 с. 11. Doyle, A. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology / A. Doyle, J.B. Griffiths. – 1998. – 332. p. 12. Jakoby, W.B. Cell Culture / W.B. Jakoby, I.H. Pastan. – 2004. – p. 639. 13. Pollard, J.W. Basic Cell Culture Protocols, 2nd ed / J.W. Pollard. – 2004. – 482 p. 14. Van Wezel, A. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture / A. Van Wezel // Nature. – 1967. – Vol. 216. – P. 64–65.

УДК: 578:57.083

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК

Бальшева В.И., Капустина О.В., Закутский Н.И., Прудникова Е.Ю., Лукшин А.Л.

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии», г. Покров, Россия

Представлены результаты изучения культивирования вируса лихорадки долины Рифт в перевиваемых линиях клеток стационарным и роллерным способами. Наиболее перспективными являются культуры клеток ПС, ПСГК-60, МДВК, в которых вирус накапливается в высоких титрах инфекционной ($8,53 \pm 0,21 \text{ Ig MICLD}_{50}/\text{см}^3$) и антигенной (в РПГА - 1: 64-128) активности.

The results of study of cultivation of Rift Valley fever virus in cell lines and stationary roller ways. Are the most promising cell culture PS, PSGK-60 MDVK, in which the virus accumulates in high titres of infectious ($8,53 \pm 0,21 \text{ Ig MICLD}_{50}/\text{sm}^3$) and antigen (reaction of passive hemagglutination in - 1: 64-128) activity.

Введение. Лихорадка долины Рифт (ЛДР) - зооантропонозная трансмиссивная остро протекающая болезнь с признаками интоксикации, лихорадки, некротического гепатита, геморрагического гастроэнтерита, с высокой летальностью среди ягнят и козлят. Возбудитель относят к семейству Bunyaviridae рода Phlebovirus. В настоящее время ЛДР является объектом пристального внимания исследователей, т.к. является особо опасным зооантропонозом и наносит огромный экономический ущерб, который складывается из потерь от аборт, высокого процента гибели молодняка, резкого снижения продуктивности скота, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, а также на госпитализацию и лечение людей (1). Эпизоотическое проявление болезни в виде эпизоотических вспышек и эпизоотий имеет место в африканских и азиатских странах. Однако имеются сообщения об обнаружении антител в крови шведских солдат из контингента войск ООН, что свидетельствует о возможности заноса болезни в страны Европы (2). Глобальное потепление может привести к увеличению числа и распространению потенциальных переносчиков возбудителя болезни - комаров *Cx. tritaeniorhynchus* и *Ae. vexans arabiensis*. Поэтому существует угроза распространения лихорадки долины Рифт и в Европе (3).

В связи с тем, что применение живых вакцин для профилактики ЛДР связано с потенциальной опасностью (реверсия, рекомбинация с полевыми изолятами), особую значимость приобретают инактивированные вакцины для защиты людей и животных. Производство инактивированных вакцин связано с наработкой большого количества вирусного сырья с высокой инфекционной активностью (4), в связи с чем поиск культуральных клеточных систем и разработка оптимальных параметров культивирования вируса всегда имеет важное значение для разработки вакцинных препаратов.

Поэтому целью наших исследований являлось изучение репродукции вируса ЛДР в перевиваемых линиях клеток – как наиболее технологичных продуцентов вирусного сырья.

Материалы и методы. Вирус ЛДР: вакцинный штамм «1974-ВНИИВВиМ» с инфекционной активностью $6,0-6,5 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$ получен из коллекции микроорганизмов ВНИИВВиМ.

Перевиваемые линии клеток почек: сирийского хомячка (ВНК-21/13); эмбриона козы (ПЭАК), теленка (МДВК), зеленой мартышки сайги (ПС), сибирского горного козерога (ПСГК-60), (СВ-1), овцы (ПО), эмбриона кролика (ПЭКр-85). Для сравнения эффективности накопления вируса ЛДР в первичных и перевиваемых культурах клеток использовали первичную культуру клеток почки ягненка (ПЯ).

Среда Игла (МЕМ) фирмы Sigma (США), среда 0,25% ФГМ-суспензионная, обогащенная витаминами группы "В" и глутамином ($600 \text{ мг}/\text{дм}^3$) с добавлением 5-10% сыворотки крови КРС; забуференный физиологический раствор (ЗФР) pH 7,2-7,4; 0,02%-ный раствор версена; 0,25%-ный раствор трипсина, бактериальные среды.

Культивирование вируса ЛДР в перевиваемых культурах клеток. Вирус выращивали при 34°C и 37°C в стационарных и роллерных условиях до проявления ЦПД и поражения 80-100% монослоя культуры клеток.

Инфекционную активность вируса определяли титрованием в элективной клеточной культуре или на мышцах по общепринятой методике. Для титрования использовали клинически здоровых беспородных белых мышей 1-3 дневного возраста. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в $\text{Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $\text{Ig MLD}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

Результаты исследования и обсуждение. При культивировании вируса в указанных выше однослойных культурах клеток изучали зависимость накопления вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» от множественности заражения (от 0,01 – 0,000001 $\text{TЦД}_{50}/\text{кл}$), содержания сыворотки КРС в поддерживающей среде, pH, длительности культивирования при стационарном методе культивирования.