ДРУГИЕ ОСОБО ОПАСНЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 619:578.831.2:57082.96

Н.И. Герасимова, С.К. Старов, В.Н. Герасимов

РАЗРАБОТКА СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА К37/70 ВИРУСА ЧУМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ СПЭВ 17/91

Введение

Чума крупного рогатого скота (КРС) — остро контактно-вирусное заболевание парнокопытных животных. В настоящее время чума КРС полностью не искоренена, находится под особым контролем международных и государственных ветеринарных служб. Для производства биопрепаратов предложены 4 вакцинных штамма вируса чумы КРС: L, RВОК, ЛТ, К37/70 [8, 10, 11, 14]. В России разработаны вакцины из аттенуированных штаммов К37/70 и ЛТ, которые обеспечивают формирование напряженного иммунитета у животных [6, 9, 11, 13]. Для изготовления и контроля вакцин и диагностикумов при чуме КРС во ВНИИЗЖ используют различные перевиваемые культуры клеток [3, 4, 5, 12, 14], которые выращивают на питательных средах с содержанием 10 % сыворотки крови КРС. Кроме этого, для поддержания культур клеток в период накопления вируса чумы КРС в среду вносят 5% аналогичной сыворотки, что ведет к повышенному расходу сыворотки и усложняет технологию.

В задачу исследований входила разработка и оптимизация способов культивирования вируса чумы КРС штамма К 37/70, обеспечивающих максимальное накопление вирусной массы в клеточной линии СПЭВ 17/91 для приготовления высокоэффективных вакцин и специфических диагностикумов.

Материалы и методы

Вирус. Использовали аттенуированный вакцинный штамм К37/70 вируса чумы КРС, выращенный в перевиваемой линии культуры клеток СПЭВ 17/91 с биологической активностью $7,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ по отработанной ранее методике [12, 13, 14].

Культура клеток. Для культивирования вируса был использован штамм СПЭВ 17/91 перевиваемой линии культуры клеток СПЭВ (свиная почка эмбриональная версенезированная), полученный во ВНИИЗЖ в 1991 году [5]. Для определения биологической активности вируса использовали первично трипсинизированную культуру почки теленка (ПТ), ее субкультуры, а также перевиваемую клеточную линию СПЭВ, хранящуюся в жидком азоте в коллекции клеточных культур в ФГУ «ВНИИЗЖ». В лаборатории клеточную линию после размораживания поддерживали серийным пассированием в монослое в плоских и вращающихся стеклянных сосудах (круговом монослое).

Питательная среда. В качестве ростовой среды для перевиваемой культуры клеток СПЭВ применяли полусинтетическую питательную среду ПСП, изготавливаемую в ФГУ «ВНИИЗЖ», с добавлением непосредственно перед работой 600 мг/см³ глутамина, 5% и 10% сыворотки крови КРС. В качестве поддерживающей среды при культивировании клеток СПЭВ, инфицированных вирусом чумы КРС, использовали аналогичную среду ПСП с внесением в нее 5% и 2% сыворотки крови КРС, 600 мг/см³ глутамина, 100 мг/см³ канамицина непосредственно перед инокуляцией вируса, а также среду ПСП без сыворотки.

Статистическую обработку полученных данных вели по методам, описанным в руководствах Ашмарина И.П. и Воробьева А.А. (1962), Садовского Н.В. (1987), а также использовали компьютерную программу «Statistica for Windows (USA, Release 4, 3, Inc.1993). Титр вируса выражали $\text{lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$.

Стерильность клеточного и вирусосо-

держашего материалов определяли в соответствии с ГОСТ 280-85. Контроль культур клеток и сыворотки на контаминацию микроплазмами проводили с использованием триптического перевара сердца КРС методом высева на бульон и полужидкий агар (0,3%).

Результаты исследований

Влияние концентрации сыворотки крови КРС на рост биомассы клеток СПЭВ при роллерном методе культивирования. Проводили исследования по снижению объема сыворотки крови КРС в среде ПСП при выращивании культуры СПЭВ. Перевиваемую линию клеток СПЭВ, предназначенную для культивирования вируса чумы КРС, выращивали в питательной среде ПСП (рН 7,0–7,1) с добавлением 5% и 10% сыворотки крови КРС в 3 литровых стеклянных сосудах цилиндрической формы (площадь стенок в сосуде – 1120–1160 см²) на роллерной установке промышленного типа, при скорости вращения 12 об/час, при температуре 37,0–37,5° С, при посевной концентрации клеток 100 тыс./см³. Оценку качества клеток и плотности монослоя определяли микроскопированием при 150–200 кратном увеличении объекта. Результаты опытов по выявлению влияния концентрации сыворотки на накопление биомассы клеток во вращающихся сосудах приведены в таблице 1.

Данные роста клеток СПЭВ, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что клетки культуры СПЭВ при посевной концентрации 100 тыс./см³ в ростовой среде ПСП с 10% сыворотки КРС на 72 ч дают плотный монослой с общей массой 330 млн клеток в роллерном сосуде.

Подобные результаты получали при инкубировании клеток СПЭВ в течение 96 ч в среде ПСП с 5% сыворотки КРС.

Далее проводили опыты по оптимизации условий размножения вируса чумы

КРС в испытуемой культуре клеток СПЭВ.

Обработка рационального использования сыворотки крови КРС при культивировании вируса чумы КРС в культуре СПЭВ. В целях обработки влияния концентрации сыворотки на результаты размножения штамма К-37/70 вируса чумы КРС в культуре клеток СПЭВ проводили 4 варианта культивирования: в 1 варианте – с использованием в поддерживающей среде ПСП 5% сыворотки крови КРС, во 2 варианте – 2% сыворотки крови КРС, в 3 варианте – без сыворотки крови КРС, в 4 варианте – выращивание вируса вели в культуре клеток без замены ростовой среды (таблица 2).

Технологическую операцию подготовки культур клеток к инфицированию и инкубирование вируса в опытных условиях осуществляли следующим образом.

Из роллерных сосудов с плотным монослоем сливали ростовую среду. Монослой клеток дважды отмывали солевым раствором Хенкса (рН 7,1–7,2). Затем культуру клеток инфицировали вирусом чумы КРС в дозе 0,2–0,3 ТЦД₅₀/кл. Контакт вируса с клетками осуществляли при температуре 37,0–37,5° С в течение 1 часа. Далее в роллерный сосуд с интактным вирусом вносили по 300 мл поддерживающей среды ПСП (рН 7,4–7,5) для каждого варианта опыта с добавлением 600 мг/см³ глутамина, 100 мг/см³ канамицина.

Через 48 ч культивирования вируса чумы КРС в культуре клеток СПЭВ проводили смену поддерживающей среды ПСП на новую поддерживающую среду аналогичного состава, соответствующего каждому варианту опыта. Далее продолжали выращивание вируса в первоначальных условиях.

Через 96 ч культивирования вируса при поражении 80–90% клеток монослоя инфицированную культуру клеток в роллерных сосудах однократно заморажива-

Таблица 1

Влияние концентрации сыворотки крови КРС на рост биомассы клеток СПЭВ при роллерном культивировании

№ п/п	Показатели роста клеток	Концентрация сыворотки в среде	
		5%	10%
1	Посевная концентрация клеток (тыс./см ³)	100	100
2	Продолжительность формирования клеточного монослоя (часы)	96	72
3	Качество монослоя (плотность)	сплошной плотный монослой	сплошной плотный монослой
4	Накопление общей биомассы клеток в роллерном сосуде (млн)	340±10	330±10

Культивирование вируса чумы КРС в перевиваемой линии клеток СПЭВ

Варианты использования среды ПСП с разными концентрациями сыворотки крови КРС		СПЭВ 17/91		
накопление биомассы				
Культура клеток СПЭВ	вируса чумы КРС, шт.37/70		часы культивирования вируса в культуре титр вируса $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.	
	% сыворотки в среде ПСП/ часы культивирования			
	После контакта вирус-клетка	48	96	120
Опыт ПСП с 10% сыворотки	ПСП с 5% сыворотки	смена среды с 2% сыворотки	6,87±0,53	6,75±0,35
		без смены среды	6,37±0,43	6,37±0,43
	ПСП с 2% сыворотки	смена среды с 2% сыворотки	6,87±0,53	6,75±0,35
		без смены среды	6,00±0,71	5,75±0,35
	ПСП без сыворотки	смена среды без сыворотки	6,25±0,35	6,12±0,53
		без смены среды	5,75±0,35	5,62±0,18
культивирование вируса без смены ростовой среды в течение 120 часов			6,12±0,53	6,50±0,71
Контроль ПСП с 10% сыворотки	ПСП с 5% сыворотки	ПСП с 5% сыворотки	6,75±0,35	6,25±0,35

ли при температуре -40° С и оттаивали при температуре 37,0–37,5° С во вращающихся сосудах на роллерных установках. Затем вирусосодержащие суспензии объединяли, маркировали и исследовали на стерильность и биологическую активность.

Полученные вирусосодержащие суспензии проверяли на стерильность методом высева на бактериальные среды и определяли биологическую активность вируса путем титрования проб в первично трипси-низированной культуре клеток почки теленка (ПТ), а также в перевиваемой культуре клеток СПЭВ.

Результаты опытов по изучению влияния концентрации сыворотки крови КРС при культивировании штамма К37/70 вируса чумы КРС в клеточной линии СПЭВ на скорость размножения и накопление инфекционной активности обобщены в таблице 2.

Данные, представленные в таблице 2, показывают, что инфекционная активность выращенного вируса варьировала в пределах 5,62–7,40 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, зависела от способа выращивания, а также от концентрации в среде ПСП сыворотки крови КРС, использованной для выращивания штамма К-37/70 вируса чумы КРС.

Из полученных вирусосодержащих материалов с активностью 7,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ было приготовлено несколько серий лио-

филизированной культуральной вакцины против чумы КРС с активностью не ниже 6,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Все серии биопрепаратов прошли положительный контроль на соответствие ТУ при проверке в отделе биологического и технологического контроля Федерального центра охраны здоровья животных (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Обсуждение результатов

В успехе биотехнологии вакцинных и диагностических антивирусных препаратов важное место занимает решение вопросов по выбору системы культивирования специфического антигена в культуре клеток. Значительно повышены требования к качеству вируса, репродуцированного в чувствительной клеточной системе [2, 6, 9]. В целях приготовления вирусосодержащего сырья для изготовления вакцин против чумы КРС снижение числа технологических приемов, количества сыворотки крови КРС, как одного из важных компонентов питательных сред, которые увеличивают риск контаминации препарата и увеличивают стоимость биопрепаратов, были основными задачами настоящей работы.

Для накопления вакцинного штамма К37/70 была использована гетерологичная культура клеток СПЭВ 17/91, многосторонне изученная во ВНИИЗЖ и защищенная патентом РФ [4, 5].

Результаты культивирования по изу-

ченным схемам получения вирусосодержащего сырья свидетельствуют о возможности снижения количества сыворотки крови КРС в существующей биотехнологии. Лучшие результаты были получены при выращивании вируса на среде ПСП с добавлением 2–5% сыворотки в течение первых 48 часов, затем на среде ПСП с 2% сыворотки. Количество сыворотки было достаточным для обеспечения условий размножения штамма К37/70 до максимальной зафиксированной инфекционной активности, равной $7,0\text{--}7,4 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Увеличение сыворотки до 5% в составе поддерживающей среды ПСП не способствовало росту титра вируса, вероятно, по причинам имеющих биологических свойств аттенуированного штамма, его взаимодействия с испытанными клетками *in vitro*, условиями

культивирования, накопления метаболитов при длительном инкубировании культуры и вируса в стационарных условиях. [1, 3, 7, 11, 15]. В связи с этим заслуживает внимание результат культивирования вируса чумы КРС без смены среды в клеточной линии СПЭВ 17/91 на ростовой среде ПСП с 10% сыворотки (4-вариант опыта).

Выводы

1. Отработан рациональный способ культивирования штамма К37/70 вируса чумы КРС на клеточной линии СПЭВ 17/91 с использованием поддерживающей среды ПСП с 2% сыворотки крови КРС.

2. Разработанный способ масштабирования вируса чумы КРС может быть использован для изготовления диагностикомов и культуральной лиофилизированной вакцины из штамма К37/70.

РЕЗЮМЕ

Определена возможность снижения количества сыворотки крови КРС в технологической схеме получения биологически активного вируса в целях изготовления вакцин и диагностикомов при чуме КРС. Разработанная схема предусматривает осуществление поддержания и масштабирования перевиваемой линии клеток СПЭВ 17/91 на питательной среде ПСП с 10% сыворотки крови КРС и проведение культивирования вакцинного штамма К37/70 вируса чумы КРС на поддерживающей среде ПСП с 2% сыворотки крови КРС в приготовленной культуре клеток СПЭВ 17/91.

ABSTRACT

The study demonstrates the possibility of bovine blood serum quantity reduction in the procedure of obtaining biologically active virus for preparation of rinderpest vaccines and diagnostics. The developed procedure covers maintaining and scaling of passaged porcine embryo kidney cell line 17/91 in semisynthetic nutrient wall medium with 10% bovine blood serum, and cultivation of rinderpest virus vaccine strain K37/70 in semisynthetic nutrient wall medium with 2% bovine blood serum in prepared porcine embryo kidney cell culture 17/91.

Литература

1. Под ред. Р.Е. Спiera, Дж. Б. Гриффитса. Биотехнология клеток животных. Т. 1. М.: Агропромиздат, 1989. 365 с.
2. С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова, В.М. Чернов, М.С. Вонский. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. СПб.: Наука, 2002. 319 с.
3. В.Н. Герасимов. Получение, поддержание и использование постоянных линий клеточных культур в ветеринарной вирусологии // Совр. аспекты патологии ж-ных: сб. докл. конф., посвящ. 40-летию ВНИИЗЖ. Владимир, 1999. С. 152–161.
4. Н.И. Герасимова, С.К. Старов, Н.Н. Дрягалин и др. Репродукция вируса чумы крупного рогатого скота в культурах клеток ЛЭК и КСТ // Науч. основы технол. пром. произ-ва вет. биол. препаратов: тез. докл. 5-й Всерос. конф. Щелково, 1996. С. 73.
5. А.А. Гусев, Ш.К. Куляшбекова, В.Н. Герасимов и др. Пат. 2140451 Российская Федерация, МПК⁶ С12№ 5/06. Штамм культивируемых клеток почки *Suis domestical*. для культивирования вирусов животных.
6. В.И. Жестерев, В.В. Башаев, И.Ф. Вишняков и др. Инактивированная вакцина из вакцинного штамма ЛТ против чумы крупного рогатого скота // Вирусные болезни с.-х ж-ных: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. Владимир, 1995. С. 140.
7. Под ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситькова. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии. М.: Спутник, 2000. 400 с.
8. А.А. Коломьцев, В.В. Куринов, А.В. Луницын и др. Вспышка чумы КРС в Амурской области в 1998 г. // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзот. болезнями ж-ных: матер. Междунар. науч.-практ. конф. Покров, 1998. С. 149–150.
9. Ф.П. Курченко, К.Н. Груздев, С.К. Старов и др. Унификация методов оценки качества вакцин против чумы крупного рогатого скота // Сб. науч. тр. ВГНКИ. М., 2001. Т. 63. С. 60–65.
10. Е.С. Орлова, П.К. Аянот, Н.В. Двинина и др. Секвенирование и сравнительный анализ Р-гена вируса чумы КРС штамма К 37/70 // Актуал. пробл. инфекц. патологии ж-ных: матер. Международ. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2003. С. 189–195.
11. В.А. Сергеев. Вирусные вакцины. Киев: Урожай, 1993. – 368с.
12. С.К. Старов и др. Временная инструкция по изготовлению и контролю культуральных антигенов и специфической сыворотки для РСК и РДП при чуме КРС. Владимир: ВНИИЗЖ, 1993. 80 с.
13. С.К. Старов, А.А. Гусев, Б.М. Хайруллин, О.А. Борисова. Изучение иммуногенной активности инактивированной вакцины против чумы крупного рогатого скота // Вопр. вет. вирусол., микробиол. и эпизоотол.: матер. науч. корнф. Покров, 1992. Ч. 1. С. 152–153.
14. С.К. Старов, Н.Н. Дрягалин, А.А. Гусев и др. Использование перевиваемой линии клеток СПЭВ для изготовления вирусвакцины против чумы крупного рогатого скота из штамма К 37/70 // Вирусные болезни с.-х ж-ных: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. Владимир, 1995. С. 78.
15. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 1998. 928 с.