

І. М. ПОЛУПАН, кандидат ветеринарних наук
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ВАКЦИННИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН НИРКИ САЙГИ

В статті представлена удосконала технологія отримання вірусу сказу в культурі клітин нирки сайги (НС) на моделі вакцинних штамів вірусу сказу ТС-80, РБ-71 і Щолково-51 К. Запропонована технологія отримання культуральної вірусомісної суспензії, яка дозволяє від однієї моношарової культури-продуцента отримувати двократний об'єм вірусомісного матеріалу з високою інфекційною за 8 діб.

Ключові слова: вакцинні штами вірусу сказу, культура клітин, репродукція вірусу, вірусомісна суспензія, титр інфекційної активності.

При розробці технології виготовлення живих та інактивованих антирабійних вакцин важливою умовою є відбір високоімуногенних і безпечних вакцинних штамів вірусу сказу і способу їх культивування, що фактично є головними умовами при отриманні високоефективних препаратів проти сказу [1-3].

Накопичення інфекційної та антигенної активності вакцинного вірусу сказу залежить, в першу чергу, від способу культивування. Традиційно, культивування вакцинних штамів вірусу сказу проводять в стаціонарних умовах, використовуючи перещеплювані культури клітин НС, ВНК-21, Vero та ін. [4-6]. Однак, аналізуючи потенційну можливість вказаних культур клітин встановлено, що інтактна культура клітин НС може зберігатись без заміни середовища до 30-и днів. Крім того, репродукція вакцинних штамів вірусу сказу в культурі клітин НС проходить без прояву ЦПД. Ці характерні особливості культури клітин НС дають можливість для вдосконалення технології отримання культуральної вірусомісної сировини шляхом застосування методу періодичної заміни інфікованого ростового середовища [7].

Враховуючи вищесказане, **метою** досліджень було удосконалення технології отримання вірусомісного матеріалу штамів ТС-80, РБ-71 і Щолково-51 К з використанням культури клітин НС із застосуванням різних варіантів методу періодичної заміни інфікованого ростового середовища.

Матеріали і методи:

В роботі використовували:

Вірус сказу, вакцинний штам Щолково-51 К, одержаний в лабораторії сказу ІВМ НААН та задепонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) 23.05.2002 р. (реєстраційний номер 206), адаптований до перещеплюваної культури клітин НС (нирки сайги) – 10-12 пасаж, інфекційна активність $6,3-7,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$;

Вірус сказу, вакцинний штам 71 БелНІІІЭВ-ВГНКИ (РБ-71), 20-й пасаж у перещеплюваній культурі клітин НС, інфекційна активність $6,0-6,8 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Вірус сказу, вакцинний штам ТС-80, 72-й пасаж у перещеплюваній культурі клітин НС, інфекційна активність $6,1-6,5 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$

Культивування вакцинних штамів вірусу сказу проводили в стаціонарному пристінковому моношарі культури клітин НС. Зараження культури клітин вірусом проводили в сформований (90-100 %) моношар культури клітин НС з множинністю зараження 0,1 МЛД₅₀/клітину. Використовували середовище Ігла (MEM) з додаванням 5-7 % сироватки крові ВРХ. Інкубацію проводили в CO₂-інкубаторі при 37 °С, 5% CO₂ та 95 % вологості протягом 5-6 діб.

При удосконаленні технології отримання вірусомісного матеріалу інфіковану (множинність зараження 0,1 МЛД₅₀/клітину) культуру клітин НС інкубували 11 діб, проводячи заміну ростового середовища на 5-у і 8-у добу на свіже аналогічного складу (середовище Ігла (MEM) з додаванням 5% сироватки крові ВРХ); або культивували 8 діб, замінюючи ростове середовище однократно на 5-у добу інкубування.

По завершенні репродукції вірус двічі заморожували (мінус 18±2 °С) – відтаювали (18-22 °С). При відтаюванні культуральні ємкості енергійно струшували для повного відставання клітин від скла. Вірусомісний матеріал об'єднували, відбирали проби для визначення інфекційної активності.

Інфекційну активність вірусомісних суспензій визначали *in vivo* шляхом титрування на білих мишах за методом Н. Корговські [8].

Досліди проводили з числом повторюваності (≥3), що забезпечувало отримання достовірних результатів. Обрахунок середньої арифметичної величини (М) і середньої квадратичної похибки (m) проводили з використанням методів статистичної обробки [9] з використанням програми MS Excel.

Результати досліджень

Метод разового вирощування. Для порівняльного аналізу потенційних можливостей удосконалення технології отримання робічного вірусомісного матеріалу початковим етапом було отримання за стандартною методикою суспензій вірусу сказу вакцинних штамів ТС-80, РБ-71 і Щолково-51 К та визначення їх інфекційної активності. Встановлено, що титри інфекційної активності культуральних суспензій вакцинних штамів вірусу сказу ТС-80, РБ-71 і Щолково-51 К протягом проведених 12-и послідовних пасажів в культурі клітин НС знаходились в межах 5,55-7,19 lg МЛД₅₀/см³ залежно від штамової належності. Результати досліджень представлені на рисунку 1.

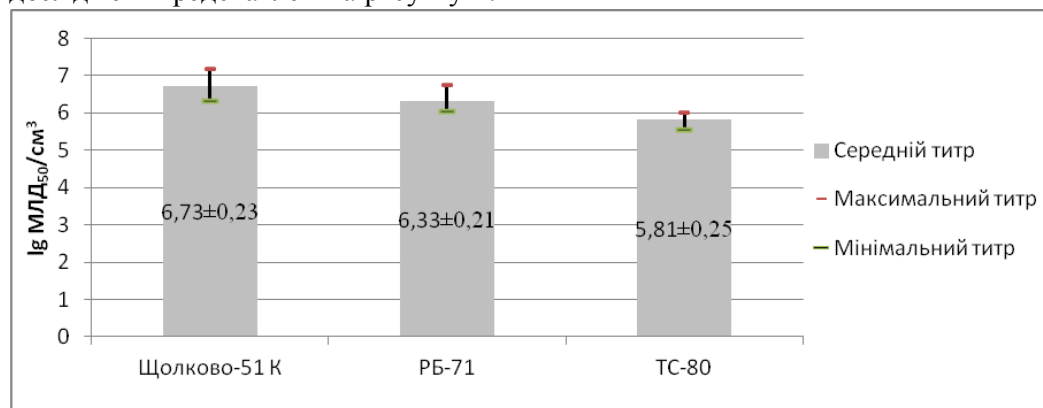


Рис. 1. Інфекційна активність вакцинних штамів вірусу сказу ТС-80, РБ-71 і Щолково-51 К отриманих в культурі клітин НС при застосуванні стандартної методики культивування (М±m, n=3).

Так, титр інфекційної активності культуральної суспензії вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51 К був у межах $6,73 \pm 0,23 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, титр штаму РБ-71 становив $6,33 \pm 0,21 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а інфекційний титр штаму ТС-80 – $5,81 \pm 0,25 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Метод періодичної заміни середовища.

Для проведення досліджень, інфікування культури клітин НС вірусом сказу (штами ТС-80, РБ-71, Щолково-51 К) проводили в сформований моношар при множинності зараження $0,1 \text{МЛД}_{50}/\text{кл}$. Інфіковану культуру клітин культивували 11 діб, проводячи на 5-у і 8-у добу відбір (злив) інфікованого середовища і внесення свіжого аналогічного складу (Ігла (МЕМ) з додаванням 5% сироватки крові ВРХ). Результати дослідів представлені на рисунку 2.

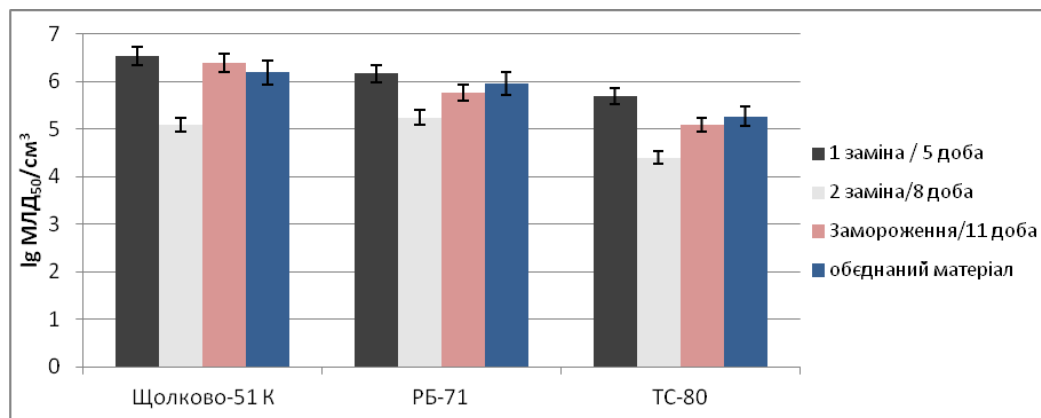


Рис. 2. Репродукція вакцинних штамів вірусу сказу в культурі клітин НС при періодичній (двократній) заміні середовища ($M \pm m$, $n=3$).

Проведені попередні дослідження показали, що незалежно від використаного штаму максимальне накопичення вірусу відмічали в матеріалі, отриманому при першій заміні (на 5-у добу). При множинності зараження $0,1 \text{МЛД}_{50}/\text{кл}$ для штаму ТС-80 титр інфекційної активності становив $5,69 \pm 0,07 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, для штаму РБ-71 – $6,17 \pm 0,02 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а для штаму Щолково-51 К – $6,53 \pm 0,03 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$. При встановленні інфекційної активності вірусних суспензій у разі наступної заміни ростового середовища (8 доба) спостерігали зниження титру вірусу сказу залежно від штаму на $0,9$ - $1,5 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Усі вірусомісні матеріали, які було заморожено на 11 добу культивування, володіли вищою інфекційною активністю ніж матеріали при повторній заміні середовища на 8-у добу, що обумовлено наявністю в суспензії не тільки позаклітинного, але й внутрішньоклітинного вірусу, вивільнення якого відбулось після руйнації клітин при заморожуванні-відтаюванні. Так, інфекційна активність замороженого-розмороженого на 11-у добу вірусомісного матеріалу штаму Щолково-51 К становила $6,40 \pm 0,05 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, штаму РБ-71 – $5,76 \pm 0,07 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а штаму ТС-80 – $5,09 \pm 0,07 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

При дослідженні інфекційної активності загального пулу кожного зі штамів отримали наступні дані: титр штаму Щолково-51 К становив $6,19 \pm 0,04 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, штаму РБ-71 – $5,95 \pm 0,10 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а штаму ТС-80 – $5,27 \pm 0,12 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Застосування даної методики дало змогу отримати 3-х кратне збільшення кількості вірусомісного матеріалу, однак, в титрах нижчих (на $0,5-0,7 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$), ніж при стандартній методиці вирощування вірусу сказу в культурі клітин НС.

Удосконалення методу періодичної заміни середовища.

В зв'язку з отриманими результатами, проведене вдосконалення методики періодичної заміни середовища, внаслідок чого інфіковану (множинність зараження $0,1 \text{МЛД}_{50}/\text{кл}$) культуру клітин НС культивували 8 діб, проводячи на 5-у добу відбір вірусомісного середовища і внесення свіжого, аналогічного складу. Тобто, отримання вірусомісного матеріалу здійснювали у дві стадії – на 5-у добу при заміні середовища і на 8-у – після закінчення культивування.

Культуральний матеріал піддавали двократному замороженню і робили загальний пул кожного зі штаму вірусу (вірусомісне середовище, замінене на 5-у добу, та заморожене-розморожене, отримане на 8-у добу). Таким чином, проведено три пасажі вірусу сказу вакцинних штамів Щолково-51 К, РБ-71 і ТС-80 у культурі клітин НС. Результати представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Інфекційна активність вірусу сказу в культурі клітин НС при однократній заміні середовища на 5-у добу культивування ($M \pm m$, $n=3$)

Штам вірусу	Титр вірусу, $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$		
	1 пасаж	2 пасаж	3 пасаж
Щолково-51 К	$6,79 \pm 0,11$	$7,17 \pm 0,10$	$7,0 \pm 0,19$
РБ-71	$6,55 \pm 0,17$	$6,34 \pm 0,10$	$6,57 \pm 0,09$
ТС-80	$5,95 \pm 0,09$	$5,84 \pm 0,10$	$6,04 \pm 0,03$

Титр інфекційної активності об'єднаних матеріалів (культурального вірусомісного середовища, заміненого на 5-у добу та замороженого-розмороженого на 8-у добу) трьох пасажів, проведених таким чином, склав для штаму ТС-80 $5,83-6,05 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, РБ-71 – $6,33-6,70 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ і Щолково-51 К – $6,67-7,18 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Отримані результати демонструють, що застосування методики одноразової заміни (на 5-у добу) інфікованого середовища дозволило отримати вірусомісний матеріал з високою інфекційною активністю (титр штаму Щолково-51 К до $7,17 \pm 0,10 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, штаму РБ-71 до $6,57 \pm 0,09 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а штаму ТС-80 до $6,04 \pm 0,03 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$).

Аналізуючи отримані результати, достовірних відмінностей в титрах інфекційної активності дослідних штамів вірусу сказу, отриманих при стандартній методиці разового вирощування (титр штаму Щолково-51 К $6,73 \pm 0,23 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, штаму РБ-71 – $6,33 \pm 0,21 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, штаму ТС-80 – $5,81 \pm 0,25 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$) та при застосуванні методики одноразової заміни інфікованого середовища, не виявлено. Однак, в усіх штамів відмічена тенденція до більшого титру при застосуванні методики одноразової заміни інфікованого середовища.

Висновки:

Удосконалена технологія отримання культурального матеріалу вакцинних штамів вірусу сказу ТС-80, РБ-71 і Щолково-51 К шляхом застосування кованого методу періодичної (одноразової) заміни інфікованого середовища.

Метод одноразової заміни інфікованого середовища дав змогу від однієї моношарової культури-продуцента отримати двократний об'єм вірусовмісного матеріалу за 8 діб, в той час як при стандартній методиці для отримання аналогічного об'єму культурального вірусовмісного матеріалу необхідно 10-12 діб.

1. *Груздев К. Н.* Бешенство животных / К. Н. Груздев, В. В. Недосеков – М.: «Аквариум ЛТД». – 2001. – 304 с.

2. *Таршис М. Г.* Бешенство животных / М. Г. Таршис, Н. А. Ковалев, П. П. Кузнецов – Минск: Ураджай. – 1990. – 175 с.

3. *Селимов М. А.* Бешенство / Селимов М.А. – М.: Медицина, 1978. – 336 с.

4. *Лаптева О. Г.* Усовершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против бешенства: автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / Оксана Лаптева. – Покров. – 2003. – 25 с.

5. Пат. 890591 Российская Федерация, Штамм Fixedrabies virus Щелково-51 для производства антирабических вакцин / Кузнецов П. П., Иванов В. С., Кузнецова С. В., Игнатьева В. С.; заявитель и патентообладатель – Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСН. – приоритет 12.07.1980. – опубл. 11.01.1993.

6. *Красуткин С. Н.* Усовершенствование технологий производства вакцин против бешенства животных: автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук: специальность 03.00.23 «Биотехнология» / С. Н. Красуткин. – Щелково. – 2002. – 34 с.

7. *Филатова М. А.* Получение и паспортизация селекционированного штамма РБ-71/10 вируса бешенства: автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / Мария Филатова. – Покров. – 2008. – 26 с.

8. Laboratory techniques in rabies 4-ed. / Martin M. Kaplan, Hilary Koprowski. – Geneva: WHO. – 1996. – 476 p.

9. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин– М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПОЧКИ САЙГИ/ И. Н. Полупан

В статье представлена усовершенствованная технология получения вируса бешенства в культуре клеток почки сайги (ПС) на модели вакцинных штаммов вируса бешенства ТС-80, РБ-71 і Щёлково-51 К. Предложена технология получения культуральной вируссодержащей суспензии, которая позволяет от одной монослойной культуры-продуцента получать двукратный объем вируссодержащего материала с высокой инфекционной активностью за 8 суток.

Ключевые слова: вакцинные штаммы вируса бешенства, культура клеток, репродукция вируса, вируссодержащая суспензия, титр инфекционной активности.

THE IMPROVEMENT OF THE TECHNOLOGY OF OBTAINING OF THE RABIES VIRUS VACCINE STRAINS IN SAIGA KIDNEY CELL CULTURE / I. Polupan

The paper presents an improved technology of the rabies virus obtaining in Saiga kidney (SK) cell culture on the model of the rabies virus vaccine strains TC-80, RB-71 and Shchelkovo-51 K. It was proposed the technology of obtaining the virus-containing culture suspension which allows receiving the double amount of virus-containing material from one monolayer with high infectivity up to 8 days.

Keywords: vaccine strains of rabies virus, cell culture, viral replication, virus-containing suspension, infective activity titer.

Рецензент – доктор ветеринарных наук В. В. Недоссков