С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, Л.В.Савицкая, О.А.Лобовикова

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МАСШТАБИРОВАННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «МОСКВА 3253» В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация*

Изучены параметры роллерного культивирования производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в клеточной культуре Vero. Культивирование целесообразно осуществлять при температуре 32 °C, в течение 4–5 сут при начальной дозе заражения 0,1 LD₅₀/кл. с использованием поддерживающей среды 199 с добавлением 0,1 % человеческого сывороточного альбумина либо 2 % сыворотки крупного рогатого скота. Оптимальный объем среды в роллерной бутылки при культивировании вируса бешенства штамма «Москва 3253» составляет от 200 до 400 мл и зависит от площади ростовой поверхности. Подобные условия обеспечивают получение культуральной жидкости с титром вируса бешенства в иммуноферментном анализе от 1:256 до 1:512. Культуральный вирус рекомендован в качестве основы для приготовления иммунизирующего материала с целью получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Ключевые слова: бешенство, культура клеток, роллерное выращивание, антирабический иммуноглобулин.

S.V.Generalov, E.G.Abramova, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, L.V.Savitskaya, O.A.Lobovikova

Optimization of Specifications for Scaled-Up Fixed Rabies Virus Cultivation (“Moscow 3253” Strain) in Vero Cell Culture

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Studied are the parameters for roll-bottle cultivation of the production fixed rabies virus strain, “Moscow 3253”, in the Vero cell culture. Established is the fact that it is advisable to perform cultivation at 32 °C within 4–5 days, the initial infective dose being 0.1 LD₅₀/cell, using maintenance media 199 with admixture of 0.1 % human serum albumin or 2 % bovine serum. Optimum media volume in the roll-bottle for fixed rabies virus strain, “Moscow 3253”, cultivation is 200–400 ml. It depends upon the proliferating surface area. Specifications stated above provide for the obtainment of culture liquid with rabies virus titer – 1:256 – 1:512, if assayed in ELISA. This cultural virus is recommended as a basis for immunization material obtainment with a view to produce anti-rabies immunoglobulin from equine blood serum.

Key words: rabies, cell culture, roll-bottle cultivation, anti-rabies immunoglobulin.

Бешенство – особо опасное острое инфекционное заболевание человека, теплокровных диких и домашних животных, которое вследствие абсолютной летальности представляет серьезную проблему современного здравоохранения [10]. Клинические проявления бешенства после контакта с подозрительным животным возможно предупредить только при своевременной иммунизации антирабической вакциной. При тяжелых укусах пострадавшему наряду с вакциной показано введение специфического иммуноглобулина [5]. В последнем случае предпочтение отдается иммуноглобулину из сыворотки крови человека, однако данный препарат является достаточно дорогим и дефицитным. Поэтому в России для постэкспозиционной профилактики бешенства широко используют антирабический иммуноглобулин (АИГ), получаемый из лошадиной сыворотки. Единственным производителем АИГ на территории Российской Федерации является ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. В процессе производства для иммунизации продуцентов используют антиген, полученный на основе фиксированного вируса бешенства, репродуцированного в мозговой ткани кроликов. В настоящее время, в соответствии с рекомендациями ВОЗ по исключению органо-тканевого антигена, актуальны исследования,

направленные на использование культурального рабического антигена [1, 2, 3]. Ранее нами была показана эффективность применения производственного штамма вируса бешенства «Москва 3253», репродуцированного в биореакторе на клеточной культуре Vero, для получения экспериментальных образцов кроличьего и лошадиного антирабического иммуноглобулина [1, 2]. В условиях производства АИГ возникает необходимость сочетания возможности максимального накопления вируса бешенства на клеточной культуре и эффективности технологического обслуживания процесса культивирования. На наш взгляд, оптимальным решением данной задачи является использование роллерного способа культивирования [6], при котором клеточный монослой располагается по всей внутренней цилиндрической поверхности горизонтально вращающихся сосудов (роллерных бутылей) и периодически омывается питательной средой. Роллерный способ находит применение в производстве различных вакцин [4, 10], в том числе антирабических [7, 8].

Целью данного исследования явилось экспериментальное обоснование условий масштабированного культивирования клеток Vero и фиксированного вируса бешенства роллерным способом для приготовления рабического антигена.

Материалы и методы

В работе использовали перевиваемую клеточную линию Vero, предварительно проверенную на отсутствие микоплазм [6], производственный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва 3253», адаптированный к перевиваемой линии клеток Vero. Выращивание клеточной культуры осуществляли в CO_2 -инкубаторе (Sanyo) при 37°C в атмосфере 5 % CO_2 в культуральных флаконах с площадью поверхности 25, 75 и 150 см^2 . Роллерное культивирование проводили в закрытых сосудах для культивирования клеточных культур с площадью поверхности 850 и 1700 см^2 с применением инкубатора Incudrive D-I (Германия). Для выращивания клеток Vero использовали среду Игла MEM с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Репродукцию вируса осуществляли на поддерживающей среде 199 с добавлением человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) или сыворотки КРС. Для промывания клеточного монослоя от остатков среды и продуктов обмена использовали раствор Дальбекко (DPBS). Для открепления клеток с ростовой поверхности применяли раствор трипсина и версена в соотношении 1:2. Подсчет количества жизнеспособных клеток осуществляли в камере Горяева. При работе учитывали сроки образования монослоя, морфологию клеток и индекс пролиферации (ИП) – отношение конечной концентрации клеток к исходной.

Эффективность репродукции исследуемого штамма вируса бешенства оценивали титрованием вируса на белых мышках [9], а также методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора для лабораторной диагностики вируса бешенства (ФГУ «ФЦТРБ ВНИВИ», Казань). Постановку ИФА осуществляли в соответствии с инструкцией к набору. Учет ИФА проводили на спектрофотометре «Imark Biorad» при длине волны 490 нм .

Результаты и обсуждение

Задачей первого этапа исследования явился поиск оптимальных параметров культивирования клеточной культуры Vero роллерным способом. При роллерном выращивании почти вся внутренняя поверхность роллерных сосудов доступна для роста клеток, при этом в каждый момент времени со средой соприкасается только часть поверхности монослоя. Таким образом, уро-

Зависимость индекса пролиферации клеток Vero от частоты вращения роллерных сосудов. Культивирование клеток проводили в течение 96 ч. Начальная посевная концентрация $(0,2 \pm 0,05) \cdot 10^5$ кл./мл

жай биомассы зависит от частоты вращения роллерных бутылей, а также от соотношения поверхности монослоя к объему питательной среды. Частота вращения роллерных бутылей не должна быть слишком низкой, поскольку длительное нахождение клеток в газовой фазе ухудшает условия их питания. Слишком быстрое вращение может препятствовать прикреплению клеток к стенкам роллерной бутылки. В результате экспериментального выращивания показано (рисунок), что культивирование клеток Vero при частоте вращения менее 1,0 об./мин приводило к гибели клеток на 2-е и 3-и сутки; при частоте вращения более 1,5 об./мин имело место замедленное приращение клеток к поверхности бутылки, что оказывало негативное влияние на рост их популяции. На наш взгляд, оптимальным режимом является установка частоты вращения на уровне 0,3–0,5 об./мин в первые 24 ч выращивания для прикрепления клеток к стенкам сосуда, затем частоту вращения следует увеличить до 1,0–1,5 об./мин для обеспечения оптимального режима питания и газообмена клеточной биомассы. При культивировании на роллерных бутылках с площадью поверхности 850 см^2 достаточно 200 мл ростовой среды. Соответственно, при использовании роллерных бутылей с площадью поверхности 1700 см^2 необходимо 400 мл ростовой среды.

На следующем этапе осуществляли подбор условий культивирования производственного штамма вируса бешенства «Москва 3253» роллерным способом. В первой серии опытов оценивали влияние температуры культивирования и способа заражения клеточной культуры вирусом бешенства. Заражение клеток вирусом осуществляли как на клеточный монослой, сформированный на стенках роллерного сосуда, так и в клеточную суспензию в дозе 0,1 $\text{LD}_{50}/\text{кл}$. Культивирование вируса проводили в течение 96 ч при 32 и 37°C . Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют, что наибольший выход вируса имеет место при заражении суспензии клеточной культуры и культивировании вируса при 32°C . Следует отметить, что при культивировании вируса при 37°C существует тенденция к уменьшению выхода целевого продукта, что, возможно, связано с частичной температурной инактивацией вируса.

Защиту от температурной инактивации обеспечивают добавки поддерживающей среды: человеческий сывороточный альбумин или сыворотка крупного рогатого скота [9]. В предыдущих экспериментах для культивирования вируса использовали поддерживающую среду 199 с содержанием ЧСА 0,1 %. Следует отметить, что человеческий сывороточный альбумин является достаточно дорогостоящим компонентом, поэтому в следующей серии экспериментов оценивали эффективность применения сыворотки КРС в различных концентрациях. При добавлении 1 % сыворотки КРС к среде 199 наблюдали накопление вируса бешенства в титре ИФА 1:64. Использование концентраций сыворотки КРС от 2 до 5 % приводило к увеличению титра до 1:256. Аналогичный результат был получен при контрольном выращивании с использованием среды с 0,1 % ЧСА. Таким образом,

Таблица 1

Влияние способа заражения и температуры культивирования на уровень накопления вируса бешенства

Способ заражения	Температура культивирования, °С	Титр вируса в ИФА	Инфекционная активность, LD ₅₀ /кл.
Монослой	32	1:64	3,1±0,5
Монослой	37	1:64	2,9±0,3
Суспензия	32	1:256	4,6±0,3
Суспензия	37	1:128÷1:256	4,1±0,3

экспериментальные данные обосновывают возможность замены ЧСА на сыворотку КРС в концентрации не менее 2 %.

В следующей серии опытов проводили изучение накопления вируса в культуре клеток Vero в зависимости от заражающей дозы и длительности культивирования. Заражение осуществляли в суспензию клеток в дозе 0,01; 0,1; 1,0 LD₅₀/кл. Культивирование проводили при 32 °С с использованием питательной среды 199 с 2 % содержанием сыворотки КРС в течение 7 сут. Анализ выхода вирусной биомассы осуществляли с 3-х суток культивирования. Результаты представлены в табл. 2.

Использование заражающей дозы 0,01 LD₅₀/кл приводит к увеличению времени накопления вируса бешенства на 1–2 сут, чем при использовании доз от 0,1 до 1,0 LD₅₀/кл. При этом заражение клеток вирусом в дозе 0,1 LD₅₀/кл является оптимальным, поскольку увеличение дозы заражения до 1,0 LD₅₀/кл не способствовало заметному увеличению активности вируса в ИФА. Оптимальный срок инкубации вируса бешенства составил 4–5 сут при заражающей дозе от 0,1 до 1,0 LD₅₀/кл. Увеличение срока инкубации в некоторых случаях способствовало снижению уровня накопления вируса бешенства, что можно объяснить частичной термической инактивацией.

Учитывая результаты проведенных исследований, следует заключить, что роллерное культивирование штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в культуре клеток Vero следует осуществлять при температуре 32 °С в течение 4–5 сут при начальной дозе заражения 0,1 LD₅₀/кл с использованием поддерживающей среды 199 с добавлением 0,1 % ЧСА либо 2 % сыворотки КРС. Полученная в результате культивирования биомасса может быть использована в качестве основы для приготовления иммунизирующего материала с целью получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Работа выполнена по Государственному контракту № 36-Д от 08.08.2013 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

Таблица 2

Влияние дозы заражения и времени культивирования на уровень накопления вируса бешенства

Доза заражения	Титр вируса в ИФА в зависимости от срока культивирования, сут				
	3	4	5	6	7
0,01	1:32	1:32÷1:64	1:64	1:128	1:256
0,1	1:64	1:128	1:256÷1:512	1:128÷1:256	1:128÷1:256
1,0	1:64	1:128	1:256÷1:512	1:256	1:256

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 2(112):78–81.
2. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):65–8.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Матвеева Ж.В. Клеточные культуры в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(110):76–9.
4. Исаева Е.И., Мазуркова Н.А., Скарнович М.О., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н., Подчерняева Р.Я. Оптимизация роллерного культивирования вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В в культурах клеток MDCK и Vero при использовании компонентов растительного происхождения. *Биотехнология.* 2010; 6:55–62.
5. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
6. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010. 691 с.
7. Hurisa B., Mengesha A., Newayesilassie B., Kerga S., Kebede G., Bankovisky D., Metlin A., Urga K. Production of Cell Culture Based Anti-rabies Vaccine in Ethiopia. *Procedia in Vaccinology.* 2013; 7:2–7.
8. Jagannathan S., Chaansha S., Rajeeesh, Santhiya T., Charles C., Venkataramana K. Standardization and assessment of cell culture media quantities in roller polyethylene terephthalate bottles employed in the industrial rabies viral vaccine production. *Pak. J. Biol. Sci.* 2009; 12:1246–52.
9. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 476 p.
10. Silva A., Deldago I., Sousa M., Carrondo M., Alves P. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine. *Vaccine.* 2008; 26:3305–11.
11. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004.121 p.

References

1. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Galkina M.V., Mikhееva T.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Production of rabbit anti-rabies immunoglobulin using cultural antigen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 2(112):78–81.
2. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Svintsov R.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Cultural antigen in the technology for anti-rabies immunoglobulin obtainment from equine blood serum]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):65–8.
3. Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Matveeva Zh.V. [Cell structures in heterologous anti-rabies immunoglobulin production]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 4(110):76–9.
4. Isaeva E.I., Mazurkova N.A., Skarnovich M.O., Troshkova G.P., Shishkina L.N., Podchernyaeva R.Ya. [Optimization of specifications for roll-bottle cultivation of the vaccine strains (Flu viruses A and B) in MDCK and Vero cell cultures using phytogetic components]. *Biotechnologiya.* 2010; 6:55–62.
5. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.
6. Freshni R.Ya. [Animal Cell Culture: Practice Guidelines]. M.: BINOM; 2010. 691 p.
7. Hurisa B., Mengesha A., Newayesilassie B., Kerga S., Kebede G., Bankovisky D., Metlin A., Urga K. Production of Cell Culture Based Anti-rabies Vaccine in Ethiopia. *Procedia in Vaccinology.* 2013; 7:2–7.
8. Jagannathan S., Chaansha S., Rajeeesh, Santhiya T., Charles C., Venkataramana K. Standardization and assessment of cell culture media quantities in roller polyethylene terephthalate bottles employed in the industrial rabies viral vaccine production. *Pak. J. Biol. Sci.* 2009; 12:1246–52.
9. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 476 p.
10. Silva A., Deldago I., Sousa M., Carrondo M., Alves P. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine. *Vaccine.* 2008; 26:3305–11.
11. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004.121 p.

Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Savitskaya L.V., Lobovikova O.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 11.10.13.