

УДК 576.3/615.281

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА ПТИЦ В ПЕРЕВИВАЕМОЙ
ЛИНИИ КЛЕТОК ВНК-21/13 РЕАКТОРНЫМ СПОСОБОМ****Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Пухова Н.М.***ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Российская Федерация, e-mail: vnitibp@mail.ru***Wang xiu-rong***Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture and State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, China*

Показана возможность культивирования вируса гриппа птиц в культуре клеток перевиваемой линии ВНК-21/13 реакторным способом.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, культура клеток ВНК-21/13, суспензия, микроносители, биореактор.

Грипп птиц относят к эмерджентным инфекциям из-за его широкого распространения, способности протекать в форме эпизоотий и наносящего огромный экономический ущерб. Вы вспышки высокопатогенного гриппа птиц с начала 21 века начали регистрировать во многих странах мира в результате распространения гриппа перелетными птицами из стран Юго-Восточной Азии. В Россию высокопатогенный штамм вируса H5N1 был занесен дикой перелетной и водоплавающей птицей в 2005 г. Экономические потери, связанные с массовой гибелью заболевшей птицы, затратами на проведение жестких карантинных и ветеринарно-санитарных мероприятий, включая уничтожение больной птицы, были оценены в 4 млрд. евро.

Для специфической профилактики гриппа птиц применяют жидкие и сухие инактивированные вакцины. Для создания вакцины из актуального штамма, существует система мониторинга, патронируемая ВОЗ. Через лаборатории ВОЗ, расположенные по всему миру, выделяется изолят актуальных штаммов, доводится до вакцинного штамма и распространяется по биотехнологическим и фармацевтическим компаниям, производящим вакцинные препараты.

Вакцины первого поколения появились в начале 40-х годов прошлого столетия. Это цельновирионные препараты, которые изготавливались из вируса, полученного на куриных эмбрионах. Обладая высокой эффективностью, они имели ряд существенных недостатков. Из-за несовершенства методов очистки в них содержалось большое количество куриного белка, вызывающего реакции у людей и животных в виде повышения температуры тела, местных реакции в месте введения. Постепенно научились очищать вакцину от нежелательных компонентов, что повысило её безопасность.

Вакцины второго поколения содержат наиболее важные для выработки иммунитета частицы разрушенного вируса, что позволяет существенно уменьшить частоту нежелательных реакций при сохранении высокой эффективности вакцинации. Субъединичные вакцины (третье поколение) появились в 1980 году. Она содержит только два фрагмента вируса – гемагглютинин и нейраминидазу и максимально очищены от белка. И самое современное поколение – инактивированные сплит-вакцины, в которых антигенный состав изменяется ежегодно в соответствии с рекомендациями ВОЗ и содержится не сокращенный, а полноценный набор формирующих иммунитет компонентов. Дополнительные внутренние антигены в составе препаратов позволяют создавать двойную степень защиты от вируса гриппа

В течение многих лет вакцины против гриппа получали путем введения вируса в оплодотворенные куриные яйца. Этот процесс требует много времени и 270 миллионов яиц только для годового обеспечения вакциной населения США. На куриных эмбрионах производятся десятки млн. доз противогриппозных вакцин в Китае.

Американскими исследователями из Мичиганского университета, работающими под руководством профессора Paul Coussens, был разработан новый способ производства вакцины против гриппа – инфицированные вирусом гриппа клетки размножаются в биореакторах, а выделенные из клеточной культуры вирусные частицы обезвреживают и очищают от посторонних белков. Такой метод существенно ускоряет и удешевляет процесс изготовления вакцины. На клетках перевиваемой линии MDCK проведены попытки культивирования вируса гриппа китайскими исследователями [1].

Во ВНИТИБП накоплен многолетний опыт культивирования различных вирусов (Марека, бешенства, ИРТ, ПГ-3 и др.) в клетках перевиваемой линии ВНК-21/13, которые в настоящее время широко используются во всем мире для производства противовирусных вакцин [2, 3]. Это объясняется мощным ростовым потенциалом этих клеток, сравнительной неприхотливостью к питательным средам, способностью быстро приобретать или увеличивать чувствительность к различным вирусам. Но главное, эти клетки обладают уникальной способностью размножаться на разных подложках и во взвешенном состоянии, т.е. в суспензии. Суспензионный способ является наиболее производительным и позволяет в кратчайшие сроки накапливать в огромных количествах клеточную биомассу, используя для этого биореакторы различной емкости от 5 до 5000 л.

На совещании ВОЗ по клеточным культурам, используемым при производстве гриппозных вакцин еще в 1995 году (Меморандум ВОЗ, 1995) было рекомендовано разработать принципиально новые культуральные гриппозные вакцины. Особо отмечалось, что «в случае возникновения эпизоотий, эпидемий и пандемий будет необходимо в кратчайшие сроки существенно увеличить объемы производства вакцин, что трудно осуществить при использовании СПФ – эмбрионов птиц, т.к. их поставка требует заблаговременного планирования».

Была поставлена цель – исследовать возможность использования промышленных реакторных расплодов клеток ВНК-21/13 для репродукции вируса гриппа А птиц суспензионным и псевдосуспензионным способами на микроносителях (МН).

В работе использовали клетки ВНК-21/13 из криобанка ВНИТИБП и вирус гриппа птиц штамм «А/утка/Альберта/35/76 (H1N1).

Культивирование вируса в суспензии и на МН проводили в 1,5-литровых спиннерных аппаратах при постоянных оборотах мешалки со скоростью 30-40 об./мин и 100-литровом биореакторе.

Были поставлены две серии опытов по определению параметров культивирования клеток ВНК-21/13 в суспензии и на желатиновом микроносителе ВИ-3 (разработки ВНИТИБП). Культивирование проводили в течение 5 суток с отбором проб для исследования через каждые 24 ч. После получения достаточного количества клеток производили смену среды – вносили 1 литр поддерживающей безсывороточной среды с 2 мг/мл трипсина и 40 мл вирусосодержащей культуральной жидкости. Культивирование продолжали при тех же оборотах мешалки в течение 5 суток с ежесуточным отбором проб и полной заменой поддерживающей среды через 48, 72, 96 часов культивирования. Гемагглютинирующую активность полученных проб вирусосодержащей суспензии исследовали в РГА с использованием эритроцитов морской свинки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вирус гриппа может успешно репродуцироваться как в суспензии, так и монослое клеток ВНК-21/21 на микроносителе, а также на возможность получения нескольких сборов (до 3) вакцинного вируса при его репродукции в псевдосуспензионном монослое клеток на МН. Гемагглютинирующая активность при суспензионном культивировании составляла в течение 96 ч 1:8, на МН – 1:16, а в течение 120 ч – 1:8–1:32 соответственно. В обоих способах культивирования, получали вирусосодержащую суспензию свободную от балластных веществ, а в случае с МН – и от клеточного детрита.

Таблица – Гемагглютинирующая активность вируса гриппа при репродукции суспензионным и псевдосуспензионным способами на перевиваемой линии клеток ВНК-21/13

Время культивирования, ч	Гемагглютинирующая активность	
	Суспензионное культивирование	Псевдосуспензионное культивирование
24	0	0
48	0	1:2 – 1:4
72	1:2 – 1:4	1:4 – 1:8
96	1:4 – 1:8	1:8 – 1:16
120	0 – 1:2	1:8 – 1:32

Выводы. Результаты показали, что вирус гриппа может успешно репродуцироваться как в суспензии, так и монослое клеток ВНК-21/13 в псевдосуспензии на микроносителях. Отмечено, что применяемая в настоящее время технология реакторного производства биомассы клеток ВНК-21/13 вполне приемлема для крупномасштабной репродукции вируса гриппа. Однако, в силу не очень высокой чувствительности клеток ВНК-21/13 к данному штамму вируса огромные потенциальные возможности этой системы могут быть реализованы только при наличии актуальных и реасорбированных штаммов, способных накапливаться в культуре клеток ВНК-21/13 в высоких титрах [4, 5].

Список литературы

1. Shin Murakami, Taisuke Horimoto et al. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells // Journal of Virology, Nov. 2008, p.10502-10509.
2. Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И., Еремец Н.К., Иванов И.В., Салов Д.А., Лихашерстова С.В., Красуткин С.Н. Основные направления разработки и внедрения антирабических вакцин из шт.Щелково-51. Ветеринарна медицина, вып.95. Міжвідомчий тематичний науковий збірник.-2011.-С.175-177.
3. Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Зенов Н.И., Красуткин С.Н., Захарченко О.С. Совершенствование цельновирионных вакцин против бешенства животных. Вет.врач, №5, 2012.-С.5-7.
4. Wang xiu-rong, Shi lin et al. Rapid and simultaneous detection of AIV,NDV,IBV and IBDV antibodies based in a visual protein chip // Мат. межд. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». -2009. - С.351-357.
5. Qimeng Tao, Xiurong Wang, Hongmei Bao, Jianan Wu, Lin Shi, Yanbing U, Chuanling Qiao, Samuilenko A.Ya., Pukhova N.M., Hualan Chen. Detection and differentiation of four poultry diseases using assymmetric reverse transcription polymerase chain reaction in combination with oligonucleotide microarrays // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation , 2009 ,vetd-21-05«06.3d 25/6/09 22:Ш.Ш 623.

CULTIVATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS IN FINITE CELL CULTURE VNK-21/13 USING REACTORS METHOD

Samujlenko A.Ya., Grin S.A., Pukhova N.M.

All-Russia Scientific Research and Technological Institute for biologic industry, Shchelkovo, Russian Federation

Wang xiu-rong

Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture and State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, China

The possibility of avian influenza virus cultivation in finite cell culture VNK-21/13 using reactors method.

Keywords: avian influenza virus, cell culture BHK-21/13 suspension, microcarriers, bioreactor.