

БИОЛОГИЯ

УДК: 578.57.083.22

Получение вируса Блутанга на культурах клеток ВНК-21/17 и EL-4 суспензионным методом

Жугунисов К.Д., аспирант
Жунушов А.Т., докт. вет. наук, член-корр. НАН КР
Ершебулов З.Д., начальник отдела обеспечения качества
Таранов Д.С., научный сотр.
Булатов Е.А., зав. лаб.
Абдураимов Е.О. уч. секретарь

РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, п. Гвардейский, Жамбылская область, Казахстан
Национальная академия наук Кыргызской Республики, Институт биотехнологии, г. Бишкек

Авторами усовершенствованы технологии получения высокоактивных вирусосодержащих суспензий для приготовления диагностических и профилактических средств против блутанга.

Ключевые слова: блутанг, вирус, метод суспензионного культивирования, культуры клеток.

ВНК-21/17 жана EL-4 клетка культураларында Блутанг вирусун суспензиялык ыкма менен өстүрүү

Негизги эмгек блутанг алапанын каршы диагностикалык жана профилактикалык препараттарды жазоо үчүн вирустук суспензияны алуу технологиясы корсотулгон.

Негизги сөздөр: блутанг, вирус, суспензиялык өстүрүү ыкмасы, клетка культурасы.

Obtaining Bluetongue Virus In BHK-21/17 And EL-4 Cell Cultures With Suspension Method

The authors improved technology receiving of highly active virus-containing suspensions for the preparation of diagnostic and preventive means against bluetongue.

Key words: Bluetongue, virus, suspension culture method, cell culture

Введение

В настоящее время опасной инфекцией, представляющей серьезную угрозу для современного животноводства страны и региона, продовольственной безопасности Казахстана, является блутанг. Это вирусная трансмиссивная инфекция, передающаяся кровососущими насекомыми из рода Culicoides, характеризующаяся лихорадочным состоянием, воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, особенно языка, пищеварительного тракта, эпителия венчика и основы кожи копыт, а также дегенеративными изменениями скелетных мышц [1, 2]. Сегодня эпизоотическая ситуация по этой инфекции ухудшается, болезнь прогрессирует, расширяет свой ареал и в Азиатском регионе [2-7]. Для предотвращения дальнейшего распространения инфекции одним из наиболее важных и сложных вопросов в системе противоэпизоотических

мероприятий при блутанге является специфическая профилактика восприимчивых животных. Развитие специфической профилактики инфекционных заболеваний человека и животных создало необходимость разработки методов получения вирусного сырья. В связи с этим актуальным является совершенствование биотехнологического процесса получения вирусного сырья для разработки высокоэффективных диагностических и вакцинных препаратов. На сегодняшний день в литературных источниках достаточно подробно освещены вопросы культивирования вируса блутанга в различных биологических системах, в том числе в клеточных [8]. Так, вирус блутанга успешно культивируется на различных культурах клеток, в частности на ВНК-21/17, EL-4 др. [8-10]. Также описаны стационарные и роллерные методы культивирования вируса блутанга в культуре клеток. Однако данные

Подпись [подпись] заверяю [подпись]
И. К. АХУНБАЕВ АТЫНАНГЫ КЫРГЫЗ МАМЛЕКЕТТИК МЕДИЦИНА АКАДЕМИЯСЫ
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНА АКАДЕМИЯ



[Handwritten signature]

способы являются малопродуктивными, трудоемкими и неэкономичными при производстве противовирусных вакцин для животных. Наиболее перспективным в области крупномасштабной переработки вирусного сырья для приготовления вакцин является суспензионный способ выращивания клеток и вирусов. Он имеет ряд важных преимуществ, основными из которых являются: возможность быстрого масштабирования, культивирование большого количества клеток и вирусов в одном ферментере с высокой плотностью популяции; равномерные условия для клеток и вирусов по всему объему выращивания; эффективный контроль и регулировка условий культивирования, высокая экономичность метода и др. [11-13]. Несмотря на перспективность суспензионного метода выращивания клеток и вирусов, до сих пор производство ветеринарных вирусных вакцин (кроме вакцин противоящурной и антирабической) основано на использовании клеток, культивируемых в условиях стационарного или роллерного монослоя. В связи с этим представляются актуальными: получение высокоактивного вирусного сырья в перевиваемых культурах клеток ВНК-21 (2/17) и EL-4, оптимизация биотехнологических параметров суспензионного культивирования вируса блутанга, изучение и стабилизация его биологической и антигенной активности в процессе непрерывного суспензионного культивирования.

Материалы и методы

Проведение эксперимента

В опытах использовали 4-й и 16-й серотипы вируса блутанга с биологической активностью $5,50 \pm 0,12$ и $5,75 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/мл соответственно. В качестве системы культивирования использовали перевиваемые линии клеток ВНК-21/17 и EL-4. Данные линии клеток культивировали во взвешенном состоянии в лабораторных

биореакторах БИОК-022с (рис. 1) 5-литровой емкости при скорости вращения мешалки 800-1000 об/мин. Для линии клеток ВНК-21(2/17) при инкубировании использовали полусинтетическую среду (ПСС) для суспензионного культивирования, а клетки EL-4 (лимфомы индуцированной диметилбензантраценом линии мышей M57BL/6N) культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 600 мг/л глутамин, 5% сыворотки крупного рогатого скота, рН-среды колебалось в пределах 6,8-7,4. Оптимальная концентрация кислорода для культуры клеток находится в пределах от 9 до 17% или 293 мм рт. столба. Остальные параметры культивирования вируса блутанга проводили согласно ранее опубликованной работе [14]. Инфицирование клеток проводили в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл, при температуре инкубирования $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ с ежедневным подсчетом количества клеток в камере Горяева. Биологическую активность вируса определяли методом титрования в культуре клеток ВНК-21(2/17), выращенной в культуральном микропланшете при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. За инфицированной культурой клеток наблюдали в течение 8 – 10 сут. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча, выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Результаты исследований

Результаты экспериментов по адаптации культур клеток к суспензионному культивированию

Первым этапом наших исследований являлось определение способности роста культур клеток в суспензионных условиях. При проведении исследований на биореакторе БИОК-022с посевная концентрация клеток составляла не менее 400 тыс. кл/мл. При культивировании через каждые двое суток в биореактор доливали ростовую среду в объеме 500-1000 мл. Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Ростовые свойства культур клеток ВНК-21(2/17) и EL-4 при суспензионном культивировании

Питательная среда	Название клона	Посевная концентрация клеток, тыс/см ³	Количество клеток, тыс/мл ($X \pm m$), n=4			
			1-е сут	2-е сут	3-е сут	4-е сут
ПСС	ВНК-21/17	456±6	742±5	1285± 12	1425± 15	812±15
RPMI-1640	EL-4	400±12	812±0,12	1448±0,4	3230±0,2	4386±0,8

Проведенные исследования показали, что в течение четырех суток (срок наблюдения) наблюдается активный рост количества клеток, затем динамика накопления резко снижается из-за избыточного накопления продуктов метаболизма, что оказывает негативное влияние на клетки. Опыты по отработке метода культивирования культуры клеток ВНК-21(2/17) в биореакторе показали, что для достижения дальнейшего роста клеток

необходимо увеличить объемы культурального сосуда. Проведенные исследования показали, что линия клеток EL-4 пригодна для культивирования в суспензионных условиях на биореакторе БИОК-022с. При этом удается достичь концентрации клеток до 4,3-5,0 млн.кл/мл. Таким образом, указанный метод позволяет культивировать клетки в суспензионных условиях.

Результаты культивирования вируса блутанга в культурах клеток EL-4 и ВНК-21(2/17) в суспензионных условиях

При определении условий культивирования вируса блутанга в вихревом биореакторе изучали такие параметры, как: скорость перемешивания, концентрация клеток и длительность культивирования вируса. Во время эксперимента рН-среды колебалась в пределах 6,9 до 7,4, перемешивание среды проводилось в пределах 800-1100 об/мин, концентрация клеток от 1,5 до 36 млн.кл./см³ при длительности культивирования от трех до шести суток с ежедневным взятием

пробы для определения уровня накопления вируса. Результаты проведенных работ показали, что на уровень накопления вируса существенное влияние оказывает рН, также концентрация клеток очень важна для достаточного накопления вируса при суспензионных условиях культивирования. Так, было установлено, что при посевной концентрации клеток 1,5 млн/см³ на третьи – четвертые сутки культивирования вирус блутанга накапливается в титрах 4,12-7,75 lg ТЦД₅₀/см³. При этом скорость перемешивания и длительность культивирования не оказывают влияния на накопление вируса. Результаты этих опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Биологическая активность вируса блутанга, выращенного в культурах клеток EL-4 и ВНК-21 при культивировании в биореакторе БИОК-022 с

Пассажный уровень	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m), n=3				p-значение
	EL-4		ВНК-21(2/17)		
	4-серотип	16-серотип	4-серотип	16-серотип	
1	4,12±0,07	4,25±0,08	6,75±0,10	6,81±0,16	<0.0001
2	6,58±0,22	6,81±0,12	6,33±0,22	6,55±0,12	0.02
3	6,16±0,22	6,75±0,07	6,75±0,14	7,00±0,08	<0.0001
4	5,83±0,08	5,91±0,16	7,75±0,10	7,25±0,11	<0.0001
5	4,91±0,16	5,12±0,13	6,75±0,14	7,00±0,08	<0.0001
6	4,83±0,08	5,25±0,11	7,66±0,08	7,25±0,11	<0.0001

В результате проведенных опытов по культивированию вируса блутанга в суспензионных линиях клеток EL-4 и ВНК-21(2/17) установлено, что начиная с первого пассажа в использованных линиях клеток отмечена активная репродукция вируса, но более высокий уровень накопления вируса наблюдали в культуре клеток ВНК-21, чем в линии EL-4. При этом титр вируса в зависимости от культуры клеток имеет существенную разницу ($p < 0.0001$).

В дальнейших экспериментах по определению стабильности уровня накопления вируса блутанга при пассировании установлено, что по мере увеличения количества пассажей в культуре клеток EL-4 биологическая активность вируса с каждым пассажем уровнем снижается.

Таким образом, показано, что линии клеток EL-4 и ВНК-21(2/17) пригодны для культивирования вируса блутанга в суспензионных условиях.

Обсуждение

Необходимость индустриализации процесса изготовления вакцин, получения биологически активных веществ клеточной природы привела к созданию ряда высокопроизводительных способов культивирования клеток млекопитающих. Одним из наиболее эффективных является суспензионный способ культивирования, предложенный в 1953

году Оуэнс с сотрудниками. Они впервые показали способность клеток размножаться в жидкой среде в свободно суспендированном состоянии. С тех пор метод суспензионного культивирования привлекает внимание исследователей в связи с его высокой эффективностью при накоплении больших количеств клеток и вирусосодержащего материала, при изготовлении вакцин и диагностических препаратов.

Известен способ культивирования вируса блутанга в культурах клеток почки овцы (ПО), сайгака (ПС), сирийских хомячков (ВНК-21), сибирского горного козерога (ПСГК-60) и свиньи (ППК-666), в стационарных, роллерных условиях в культуральных сосудах и на микроносителях (сферические шарики диаметром от 100 до 250 мкм) при постоянном их перемешивании [8, 14].

Указанные стационарный и роллерный способы культивирования позволяют нарабатывать клеточную и вирусную биомассу на ограниченной поверхности культуральных сосудов, что является трудоемким способом. Метод суспензионного культивирования позволяет культивировать отдельные изолированные клетки во взвешенном состоянии и достигать их концентрации до нескольких миллионов на мл, что позволяет в конечном итоге получать высокоактивную суспензию, так как уровень накопления вируса зависит от концентрации клеток, поэтому чем

больше клеток, тем выше урожай вирусной биомассы. Эффективность использования этого метода для биотехнологии противовирусных препаратов во многом определяется биологическими характеристиками выбранного клеточного субстрата и тщательностью отработки параметров выращивания, оптимизацией условий культивирования вируса с сохранением его иммунобиологических свойств. В данном эксперименте нами сравнительно изучены культуры клеток ВНК-21(2/17) и EL-4, способность их роста в суспензии и чувствительность к вирусу блутанга.

Установлено, что обе линии клетки являются пригодными для суспензионного культивирования вируса блутанга. При пассировании вируса блутанга в культуре клеток EL-4 его биологическая активность с каждым пассажным уровнем снижается. В доступной литературе при поиске вопроса, касающегося чувствительности культуры клеток EL-4 по отношению к другим вирусам, в том числе к вирусу блутанга, не обнаружено, за исключением единичных данных по вирусу бешенства [15]. Где указано, что крупномасштабного выращивания вируса бешенства в культуре клеток EL-4 не проводилось, и эти исследования остались на уровне лабораторного эксперимента.

Всем известно, что в настоящее время в производстве биологических препаратов используют культуру клеток ВНК-21 в качестве субстрата для репродукции вирусов ящура и бешенства в суспензионных условиях. В доступной литературе мало информации, касающийся адаптации к суспензионному способу выращивания вируса блутанга в культуре клеток ВНК-21 и использования ее в производстве вакцин против данной болезни. Только в одной научной статье представлены результаты крупномасштабного культивирования вируса блутанга в культуре клеток ВНК-21, выращенных на микроносителях [16]. Данный способ на микроносителях заключается в культивировании клеток при их постоянном перемешивании, что является близким аналогом суспензионного метода культивирования. Однако указанный метод имеет существенные недостатки, к которым относятся: использование дополнительных дорогостоящих микрофер, которые в свою очередь имеют ограничения в поверхности, существуют дополнительные трудности при их перемешивании – в связи с их массой они постоянно оседают на дно сосудов и слипаются, что в конце концов приводит к удорожанию стоимости получаемой вирусной биомассы.

Применение биологических препаратов, полученных на основе перевиваемых клеточных линий, не всегда безопасно. Согласно существовавшему мнению, использование постоянных клеточных линий для репликации вирусов и векторных рекомбинатов в производстве вирусных вакцин, заключалось в их возможной онкогенности [17] из-за контаминации вакцин

клеточной ДНК или генными продуктами. Прежде всего это было связано с клетками ВНК-21 и противоящурной вакциной. По литературным данным, онкогенность клеток ВНК-21 для лабораторных и домашних животных хорошо изучено и установлено, что у животных (крупный рогатый скот, овцы, свиньи, крысы, кролики, морские свинки и мыши) клетки ВНК-21 не вызывают образование опухолей. Постоянный технический комитет экспертов Европейской комиссии по борьбе с ящуром FAO рекомендовал клетки ВНК-21 для изготовления вакцины, признав их безопасными для сельскохозяйственных животных. Сведений об онкогенности культуры клеток EL-4 в доступной литературе нами не обнаружено, и использование данной культуры клеток в производстве вакцинных препаратов остается открытым и требует дополнительных исследований. Поэтому культура клеток ВНК-21 на сегодняшний день является актуальной для суспензионного культивирования вируса блутанга.

Выводы

Таким образом, анализируя вышеуказанные литературные данные и результаты проведенных исследований, можно сделать вывод: актуально крупномасштабное выращивание вируса блутанга в перевиваемой линии культуры клеток ВНК-21, так как данная культура является безопасной, неонкогенной и, самое главное, чувствительной для вируса блутанга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусные болезни животных / В.Н.Сюрин, А.Я.Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В.Фомина. – М: ВНИИТИБП, 1998. – с.30-39.
2. *Мурьева Г.Б.* Актуальность контроля блутанга овец при обеспечении продовольственной безопасности Республики Бурятия // *Овцы, козы, шерстяное дело.* 2011. № 3. – с. 48-50.
3. *Lundervold M., Milner-Gnlland EJ, O'Callaghan CJ., Hamblin CA, Corteyn A.P. Macmillan A.* Serological Survey of Ruminant livestock in Kazakhstan During Post-Soviet Transitions in Farming and Disease Control. *Actavet. scand.*, 2004; 45, 211-224.
4. *Avcı O, Orhan Y, Oya B, Mehmet K, Sibel Y, Atilla S.* (2014) Detection of antibodies against Blue tongue virus in yaks (*Bos grunniens*) in Issyk kul, first report // *J Anim Plant Sci*24(4): 1220-1223.
5. *Hasanpour A., Mosakhani F., Mirzaei H. and Mostofi S.* Seroprevalence of Bluetongue Vims Infection in Sheep in East-Azarbajan Province in Iran // *Research Journal of Biological Sciences* 3 (11): 1265-1270, 2008.
6. Вспышка катаральной лихорадки овец в Бурятии / Левченко В.П., Угрюмов Г.А., Гончиков В.Г. и др // *Ветеринария.* – 1995. – №. 4. – с. 7-8.
7. *Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China / Kirkland P.D., Zhang N., Hawkes R.A. et al.*

- //Epidemiol. Infect. – 2002. – Vol.128. – №2. – P. 257-263.
8. *Бальшева В.И., Сливко В.В., Жестерев В.И.* Культивирование вируса блутанга в культурах клеток животных // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2002. – №6. – с. 46-48.
 9. *Бальшева В.И., Недосекова В.В., Чурбанова Г.Н., Жестерев В.И., Топская Р.А.* Некоторые аспекты культивирования вируса блутанга в различных культуральных системах // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных. – Покров, 2000. – с. 179-181.
 10. *Абдураимов Е.О., Кошметов Ж.К., Ершебулов З.Д., Нурабаев С.Ш.* Изучение культуральных свойств вируса катаральной лихорадки овец, выделенного в Республике Таджикистан // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. – Алматы: 2008. – с. 34-36.
 11. *Самуйленко А. Я.* Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов / А. Я. Самуйленко, Е. А. Рубан. – М., 2000. – Т. 1. – с. 190-241.
 12. *Жестерев В.И., Марквичева Е.А., Черняева И.С., Албунов А.И., Шинкарев С.М.* // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: труды Междунар. научн.-практ. конф. / ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 2003. – Ч. 2.1. – с. 553.
 13. Биотехнология / Под ред. Е. С. Воронина и др. – СПб.: ГИОРД, 2005. – с. 792
 14. *Таранов Д.С., Абдураимов Е.О., Мамадалиев С.М., Жугунисов К.Д., Ершебулов З.Д.* Определение оптимальных параметров культивирования вируса катаральной лихорадки овец // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – №4. – с. 88.
 15. *Nakamichi K, Inoue S, Takasaki T, Morimoto K, Kurane I.* Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXCL10 chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Virol.* 2004 Sep; 78 (17): 9376-88.
 16. *Garcia L., Mouriño M., Urniza A.* Comparative study of bluetongue virus serotype 8 production on BHK-21 cells in a 50L Biostat® STR single-use bioreactors vs roller bottles. // *BMC Proceedings* 2013, 7(Suppl 6): – P. 83.
 17. *Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И.* Вирусы и вирусные вакцины. – М.: Библиотека, 2007. – с. 524.