



УДК 578.832.1:57.083.226

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА A/ASTANARG/5:3/2009 ВИРУСА ГРИППА

З.Д. Ершебулов, Е.О. Абдураимов, Ш.Ж. Рыскельдинова, Ж.К. Кыдырбаев, С.М. Мамадалиев, Е.М. Кожамкулов, К.К. Табынов, Н.Н. Асанжанова, К.Д. Жугунисов, Д.С. Таранов

ershebulov@mail.ru, abduraimov_72@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан

Отработаны оптимальные параметры культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 вируса гриппа на развивающихся куриных эмбрионах, позволяющие получить высокоактивный вирусосодержащий материал для изготовления диагностических и профилактических средств.

Введение

В связи с трансконтинентальным распространением высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1 в странах евразийского континента и Африки, имеющего большую эпидемическую значимость, резко возросла потребность в вакцине для профилактической иммунизации населения Республики Казахстан. Учеными НИИПББ совместно со специалистами из НИИ гриппа РАМН МЗ РФ был получен рекомбинантный штамм A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ, сконструированный методом обратной генетики из штаммов A/chicken/Астана/6/05 (H5N1) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Основным этапом технологии изготовления вакцины является получение высокоактивного вирусосодержащего материала (ВСМ) с использованием различных систем культивирования. В настоящее время для культивирования вирусов гриппа (ВГ) в вирусологических лабораториях, а также в производственных центрах мира, широко используются развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ). В последние годы появились работы, в которых для получения инактивированной цельновирионной вакцины предлагается использование перевиваемых культур клеток [1, 2-5]. Однако, в ведущих научно-производственных центрах мира для

изготовления противогриппозных инактивированных вакцин используется традиционная система культивирования - куриные эмбрионы. В силу высокой производительности и хорошего накопления вирусов этот метод не потерял своей актуальности на сегодняшний день [6].

В этой связи целью настоящих исследований являлось определение оптимальных параметров культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ в РКЭ для получения высокоактивного вирусосодержащего материала (ВСМ), используемого при разработке технологии изготовления профилактических и диагностических средств.

Материалы и методы

В экспериментах использовали:

- рекомбинантный штамм A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ;
- РКЭ 9-13-сут возраста;
- 0,5% взвесь эритроцитов петуха;
- 96-луночные плексигласовые планшеты с «U» образным дном.

Культивирование штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ проводили на РКЭ. Инфицирование эмбрионов проводили в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Для определения оптимальной заражающей



дозы вируса эмбрионы 10-суточного возраста инфицировали в дозах 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 ЭИД₅₀/0,2 см³ и инкубировали при 33°C в течение 72 ч. После определения заражающей дозы установили оптимальный возраст эмбрионов, для чего были инфицированы эмбрионы 9, 10, 11, 12 и 13-суточного возраста. Инфицированные эмбрионы инкубировали также при разных температурных режимах (30, 33, 34, 35 и 37°C).

Инфекционную активность полученной вирусосодержащей жидкости определяли титрованием в РКЭ с последующим подтверждением наличия вируса в реакции гемагглютинации (РГА), а гемагглютинирующую активность в РГА с 0,5% эритроцитами петуха. Титр вируса рассчитывали по методу L. Reed & H. Muench и выражали в lg ЭИД₅₀/см³.

Результаты и обсуждение

Для определения оптимальных параметров культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ в РКЭ проведены исследования по изучению уровня накопления вируса при различных дозах инфицирования. При этом использовали дозы от 100 до 1000000 ЭИД₅₀/0,2 см³. Результаты проведенных исследований представлены в графике 1.

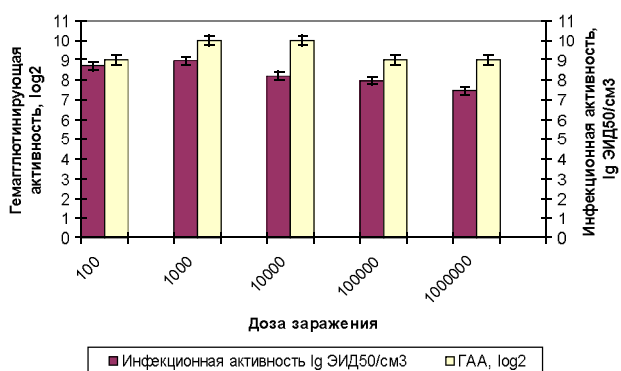


График 1 – Определение оптимальной инфицирующей дозы рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 в РКЭ

Из данных графика 1 видно, что при инфицировании РКЭ штаммом A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ в дозах 100 ЭИД₅₀/0,2

см³ инфекционная активность полученного материала не превышает 8,70 lg ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующая 1:512, тогда как при инфицировании в дозах 1000 и 10000 ЭИД₅₀/0,2 см³ накопление вируса отмечается в титрах 8,20÷8,95 lg ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующий титр при этом составляет 1:1024. При инфицировании РКЭ в дозах 100000 и 1000000 ЭИД₅₀/0,2 см³ накопление вируса отмечается на уровне 7,45÷7,95 lg ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующая в титре 1:512.

В результате проведенных исследований определена оптимальная заражающая доза рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ для РКЭ, которая составила от 1000 до 10000 ЭИД₅₀.

В следующей серии экспериментов определяли оптимальный срок инкубирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 в РКЭ для получения высокоактивного вирусного материала. Результаты исследований представлены в графике 2.

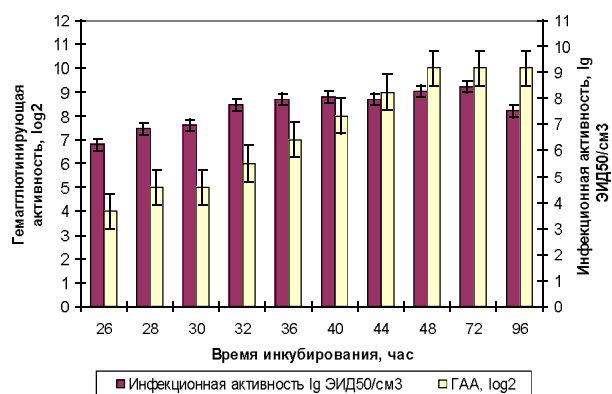


График 2 - Определение оптимального срока инкубирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ в РКЭ

Из данных графика 2 видно, что при инфицировании 10-сут РКЭ штаммом A/AstanaRG/5:3/2009 в дозе 1000 ЭИД₅₀ максимальное накопление вируса отмечается в течение 48-72 ч, где гемагглютинирующий титр составил 1:1024, а биологическая активность в пределах 9,03÷9,20 lg ЭИД₅₀/см³. При продолжительности инкубирования 96 ч, в РГА активность составила 1:1024, а биологическая 8,20 lg



ЭИД₅₀/см³. В остальных исследованных сроках инкубирования биологическая и гемагглютинирующая активность вируса была значительно ниже.

Таким образом, наиболее оптимальным временем инкубирования для получения высокоактивной биомассы рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ в 10-сут РКЭ, является 48-72 ч.

По данным, представленным в литературе [7], и результатам собственных исследований на репродукцию ВГ, в определенной степени влияет возраст РКЭ. С целью определения уровня накопления вируса в зависимости от возраста РКЭ нами проведены следующие серии исследований. РКЭ 9, 10, 11, 12 и 13-суточного возраста были инфицированы вирусом в дозе 1000 ЭИД₅₀ в аллантаисную полость. Инфицированные эмбрионы инкубировали при 33°C в течение 72 ч. Результаты исследований представлены в графике 3.

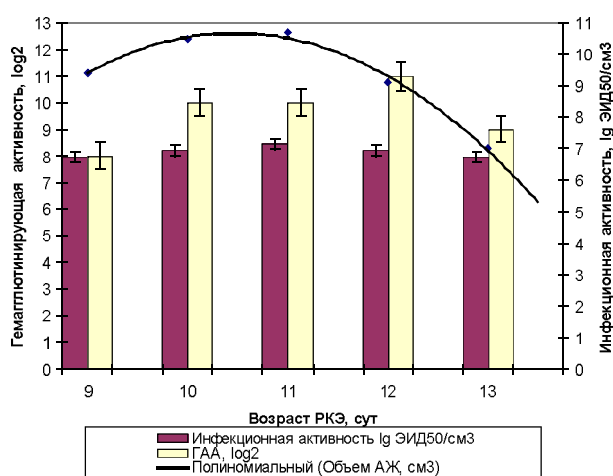


График 3 - Определение оптимального возраста РКЭ для культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ

Проведенные исследования показали (график 3), что наиболее оптимальным возрастом для получения качественного ВСМ являются 10-11 сут РКЭ, это обусловлено качеством получаемого ВСМ, прозрачностью аллантаисной жидкости (АЖ), большим объемом получаемой АЖ (до 10,7 см³). Инфекционная активность исследуемого штамма при культивировании на 10-11-сут РКЭ колебалась в пределах от 8,20±0,14 до

8,70±0,14 lg ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующий титр от 1:512 до 1:1024. При культивировании на 9, 12 и 13-сут РКЭ инфекционная активность получаемого ВСМ была на том же уровне, что и при культивировании на 10-11-сут РКЭ, а гемагглютинирующая варьировала от 1:256 до 1:1024. При использовании 12-13-сут эмбрионов отмечалось уменьшение получаемой АЖ (до 5 см³/РКЭ), а также наличие хлопьев, оперения эмбриона способствовало загрязнению АЖ, что снижало качество получаемого ВСМ.

В технологии культивирования рекомбинантных штаммов ВГ важное значение имеет температура инкубирования. Поэтому в следующей серии опытов были проведены исследования по выяснению влияния различных температурных режимов инкубирования на накопление рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 в РКЭ. Результаты исследований представлены в графике 4.

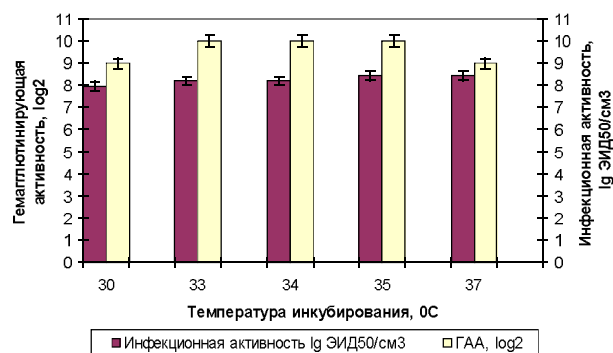


График 4 - Определение оптимальной температуры инкубирования штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ в РКЭ

Из данных графика 4 видно, что репродукция вируса наблюдается во всех испытанных температурных режимах. Наиболее оптимальным температурным режимом инкубирования по результатам проведенных экспериментов является температура от 33 до 35°C, при которой инфекционная активность составляла 8,20-8,45 lg ЭИД₅₀/см³, а гемагглютинирующая 1:1024.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены необходимые данные по оптимальным параметрам культивирования рекомбинантного штамма ВГ



для получения высокоактивной биомассы, пригодной для использования при производстве профилактических препаратов.

Отработанные нами параметры культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 в РКЭ согласуются с литературными данными [8, 9]. Так, нами были получены идентичные результаты по таким параметрам как: оптимальный возраст эмбрионов, заражающая доза вируса, температура и срок инкубирования. По данным литературы, при соблюдении определенных параметров культивирования рекомбинантных штаммов авторами получен ВСМ с активностью в РГА 1:256 -1:512 и инфекционной $8,20 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ [9, 10]. В наших экспериментах при оптимизации условий культивирования исследуемого штамма получен активный ВСМ с титром в РГА 1:1024 и инфекционной активностью до $9,20 \pm 0,08 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Литература

1. Подчерняева Р.Я., Хижнякова Т.М., Михайлова Г.Р. и др. Линия клеток VERO(B) для приготовления медикобиологических препаратов // Цитология. - 1996. - №2. - С. 241.
2. Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dörner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 1998 May-Jun;16;(9-10):960-8.
3. Kistner O., Howard K., Spruth M., Wodal W. et al. Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. *Vaccine*. 2007 August 10; 25(32): 6028-6036.
4. Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* 2005 Apr 22;23(22):2943-52.
5. Palache AM, Brands R, van Scharrenburg G.J. Immunogenicity and reactogenicity of influenza subunit vaccines produced in MDCK cells or fertilized chicken eggs. // *J Infect Dis* 1997;176 Suppl 1:S20-3.
6. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. - М.: Библионика, 2007. - С. 79.
7. Молдагулова Н.Б., Кыдырбаев Ж.К., Кожамкулов Е.М., Рыскельдинова Ш.Ж. и др. Изучение культуральных свойств штамма А/Цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц для приготовления инактивированной вакцины // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития: Междунар. науч.-практич. конф., посвящ. 50-летию науч.-исслед. ин-та пробл. биол. безопасности (19-21 мая 2008 г., Алматы). – Алматы, 2008. - С. 166.
8. Мамадалиев С.М., Кыдырбаев Ж.К., Абдураимов Е.О., Рыскельдинова Ш.Ж. и др. Определение условий культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/6:2/2009 (H5N1) вируса гриппа птиц на куриных эмбрионах // Противогриппозные вакцины нового поколения: Междунар. науч. конф.: сборник статей и тезисов (28-29 октября 2009 г., Санкт-Петербург). - Санкт-Петербург, 2009. - С. 79.

Выводы

На основании проведенных исследований установлены оптимальные параметры культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ на РКЭ:

- возраст эмбрионов - 10-11-сут;
- заражающая доза вируса - 1000 ЭИД_{50} ;
- температура инкубации - $33-35^\circ\text{C}$;
- продолжительность инкубирования - 48-72 ч.

При соблюдении указанных параметров культивирования рекомбинантного штамма A/AstanaRG/5:3/2009 ВГ можно получить вирусосодержащую суспензию с инфекционной и гемагглютинирующей активностью не менее $9,0 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и 1:1024, соответственно, что вполне соответствует предъявляемым требованиям при изготовлении инактивированной вакцины против высокопатогенного гриппа А/Н5N1.



9. Табынов К.К., Мамбеталиев М.А., Булатов Е.А., Абсатова Ж.С., Копоченя А.А. Параметры культивирования референс-вируса гриппа NIBRG-121 на развивающихся куриных эмбрионах SPF // Противогриппозные вакцины нового поколения: Междунар. науч. конф.: сборник статей и тезисов (28-29 октября 2009 г., Санкт-Петербург). - Санкт-Петербург, 2009. - С. 78

Түйін

Балау және дауалау құралдарын дайындау үшін белсенділігі жоғары вирусты материал алуға мүмкіндік беретін дамып келе жатқан тауық эмбриондарында тұмау вирусының A/AstanaRG/5:3/2009 рекомбинантты штаммын өсірудің оңтайлы параметрлері өңделді.

Summary

Parameters for cultivation of the influenza virus recombinant strain A/AstanaRG/5:3/2009 in developing chicken eggs have been optimized. They make possible to obtain highly active virus-containing material for production of diagnostic and prophylactic preparations.