

Закутский Н.И., Балышева В.И., Хухорова И.Ю., Юрков С.Г.

Инфекционные и иммуногенные свойства вируса лихорадки долины Рифт в зависимости от уровня пассажей и условий хранения

ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, 601120, г. Покров

Статья посвящена изучению влияния некоторых факторов на иммунобиологические свойства, в частности пассирования в суспензии перевиваемых клеток ВНК-21/13 и хранения при различных температурах, штамм 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР). Определены границы уровня пассажей и оптимальные условия хранения, максимально обеспечивающие инфекционную, иммуногенную активность и протективность аттенуированного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР. Установлено, что выращивание вируса ЛДР в суспензии клеток ВНК-21/13 в течение 20 последовательных пассажей и хранение при -50°C в течение 1–2 лет не снижало его инфекционных, иммуногенных и протективных свойств. Показано также, что этот вирус без снижения инфекционной и иммуногенной активности можно хранить при следующих температурных режимах: $4-6^{\circ}\text{C}$ – 1 мес., $-10-12^{\circ}\text{C}$ – 4 мес., -20°C – 6 мес., -50°C – до 2 лет.

Ключевые слова: лихорадка долины Рифт; вирус; уровень пассажей; температура хранения; инфекционность; иммуногенность; протективность.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015;60(2): 41–43.*

Zakutskiy N.I., Balysheva V.I., Khukhorova I.Ju., Yurkov S.G.

Infectious, immunogenic, and protective characteristics of the Rift Valley fever virus depending on the passage level and storage conditions

The report discusses the research into the impact of some factors, especially the passage in a suspension of continuous cells ВНК-21/13 and storage at different temperatures, upon immunobiological characteristics of the Rift Valley fever (RVF) virus strain 1974-VNIIVViM. The limits for the passage levels and optimal storage conditions providing maximal infectious and immunogenic activity, as well as protection of the attenuated RVF strain 1974-VNIIVViM, were determined. It was found that the RVF virus growth in ВНК-21/23 cell suspension in the course of 20 consecutive passages and storage at -50°C for 1 to 2 years did not reduce any infectious, immunogenic or protective characteristics of the virus. It was also shown that the RVF virus strain 1974-VNIIVViM could be stored at the following temperature ranges: 1 month at 4 to 6°C , 4 months at -10 to -12°C , 6 months at -20°C , and up to 2 years at -50°C .

Key words: *Rift Valley fever (RVF); virus; passage level; storage temperature; infectivity; immunogenicity; protection.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(2): 41–43. (In Russ.)*

For correspondence: Nikolay Zakutsky, Doctor of Veterinary Sciences; e-mail: zaknikiv43@yandex.ru

Введение

Изучение иммунобиологических свойств вирусов в зависимости от уровня пассажей в культуре клеток в процессе культивирования и условий хранения имеет существенное значение при разработке вакцинных препаратов. Это обусловлено тем, что при длительном пассировании вируса, особенно в гетерологичной культуре клеток, происходят изменения его иммунобиологических свойств [1–6]. Например, у морских свинок, с одной и той же дозой вакцины против ящура, изготовленной из вируса разных пассажей, отмечали неодинаковый уровень иммуногенности препаратов. Значительное увеличение числа пассажей вируса приводило к снижению иммуногенной активности вакцины [3]. Результаты изучения в процессе пассирования инфекционной активности вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ КРС) показали, что он не изменял своих культуральных свойств в течение 20 последовательных пассажей в культуре клеток MDBK (инфекционная активность была в пределах $7,5-8,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$), тогда как на уровне 30-го пассажа в этой культуре клеток титр его не превышал $7,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$. Аналогичные данные получены при изучении иммуногенности вируса в зависимости от уровня пассажей [2].

При производстве вакцинных и диагностических препаратов приготовленные матричные и производственные раскладки вируса хранят при определенных температурных режимах, предварительно изучив условия, обеспечивающие стабильность его свойств. Большинство штаммов длительно хранятся в нативном виде при низких температурах не выше -40°C . При разработке промышленной технологии выращивания вирусов в клеточных культурах с целью изготовления вакцинных препаратов необходимым условием является изучение допустимого предела их пассажей и оптимального режима хранения для обеспечения стабильности иммунобиологических свойств [1, 2, 5].

В связи с тем, что в доступной литературе отсутствуют данные относительно вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР) в этом аспекте целью настоящей работы было изучение влияния уровня пассажей в культуре клеток ВНК-21/13 и условий хранения вакцинного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР на его инфекционную, иммуногенную активность и протективность.

Материалы и методы

В опытах использовали аттенуированный штамм 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР, прошедший 3 и 10 пассажей в культуре клеток ВНК-21/13 (титр $6,5$ и $7,5 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$),

эпизоотический штамм Энтеббе вируса ЛДР ($5,5 \lg \text{micLD}_{50}/\text{см}^3$), суспензионную сублинию клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13) на уровне не более 30 пассажей, питательную среду Игла MEM в модификации для суспензионного культивирования, содержащую двойной набор аминокислот и витаминов группы В с 10 % сыворотки крови КРС, раствор глютамина, антибиотики (пенициллин, стрептомицин, канамицин) в рекомендуемых дозах.

Клетки и вирус культивировали суспензионным методом с использованием роллерной установки и био-реакторов (ферментеров) вместимостью 20 литров. Выращивание вируса в суспензии клеток ВНК-21/13 на роллерной установке осуществляли по разработанной методике в течение 20 последовательных пассажей с отбором проб на уровне 5, 10, 15 и 20-го пассажей для определения инфекционной, иммуногенной и протективной активности.

Вирус ЛДР, выращенный в течение 10 пассажей в культуре клеток ВНК-21/13 в ферментерах, с инфекционной активностью $7,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ хранили при разных температурных режимах.

Инфекционность вируса определяли титрованием в культуре клеток ВНК-21/13. Поскольку существует корреляция при выявлении антител в реакции нейтрализации и при иммуноферментном анализе (ИФА), иммуногенную активность вируса оценивали по титру вирусспецифических антител в сыворотках крови мышей в ИФА (минимальный защитный уровень 1:125–1:625). Протективную активность вируса на разных уровнях пассажей и при температуре хранения 4–6 и -50°C определяли на взрослых белых мышах (10 особей) путем его введения внутримышечно по $0,2 \text{ см}^3$ каждому животному. Контрольное заражение мышей проводили эпизоотическим штаммом Энтеббе внутримышечно в дозе $10\,000 \text{ LD}_{50}$ через 28 сут после прививки.

Результаты и обсуждение

При изучении влияния уровня пассажей на инфекционность, иммуногенность и протективность вирус ЛДР культивировали в клетках ВНК-21/13, которые поддерживали в суспензионной культуре отъемно-доливным способом. Исходная (посевная) концентрация клеток составляла $0,5 \cdot 10^6 \text{ кл}/\text{см}^3$, жизнеспособность – 92–97%.

В процессе культивирования вируса величину pH в необходимом диапазоне поддерживали путем добавления бикарбоната натрия. Для оценки стабильности иммунобиологических свойств вируса через каждые 5 пассажей определяли инфекционную и иммуногенную активность вирусного материала. В результате установлено, что инфекционная активность вируса ЛДР, прошедшего 5, 10, 15 и 20 пассажей в перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13, практически не изменялась ($7,0$ – $7,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$). Более высокие титры вирусспецифических антител (1:3125–1:15625) регистрировали в сыворотках крови мышей, привитых вирусом 10–20 пассажей. При этом все исследованные образцы вирусосодержащего материала на уровне 5, 10, 15 и 20 пассажей обеспечивали защиту от вирулентного вируса не менее 85 % привитых мышей, в то время как все не привитые (контрольные) животные пали.

В ходе оценки влияния температурного режима на иммунобиологические свойства вируса ЛДР его выращивание осуществляли по разработанной технологии в суспензии клеток ВНК-21/13 в ферментерах вместимостью 20 л. Стабильность инфекционных и иммуногенных свойств вируса, полученного на уровне 10-го пассажа с активностью $7,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$, изучали при разных температурах и сроках хранения. Для этого све-

жеприготовленный вирусосодержащий материал (инфекционная активность $7,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$, иммуногенность по результатам ИФА – 1:15 625) разливали в пенициллиновые флаконы ($5,0 \text{ см}^3$) и хранили при положительных (37, 18–20; 4–6 $^\circ\text{C}$) и отрицательных (-10 – -12 , -20 , -50°C) температурах. В запланированные сроки определяли инфекционную активность хранившегося при различных температурных режимах вируса ЛДР и уровень иммуногенности в ИФА по титру вирусспецифических антител в сыворотке крови привитых этим вирусом мышей. В ряде случаев оценивали протективные свойства образцов испытуемого вируса, хранившегося при 4–6 и -50°C .

Исследования показали, что при 37°C инфекционная активность вируса через сутки снижалась на $0,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$, на 3-и сутки – на $1,0 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$, а через 7 сут – на $2,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$. В то же время вирус сохранял исходную иммуногенную активность (1:15 625) в течение 3 сут, а начиная с 4-х суток эта величина снижалась до 1:3125 и находилась на этом уровне до 7-х суток.

В условиях комнатной температуры (18–20 $^\circ\text{C}$) через 1 мес инфекционная активность вируса снижалась на $0,6 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$, после 2 мес хранения – на $1,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ от исходной величины. Титр специфических антител в ИФА был в пределах 1:125–1:625.

При 4–6 $^\circ\text{C}$ хранения в течение 1 мес инфекционный титр данного возбудителя практически не изменялся и составлял $7,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (титр специфических антител в ИФА – 1:15 625), через 3 мес – $6,85 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (титр в ИФА – 1:3125), через 4 мес его активность не превышала $6,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (титр в ИФА – 1:625–1:3125).

Температура -10 – -12°C практически не влияла на инфекционную и иммуногенную активность вируса в течение первых 2 мес ($7,50$ – $7,25 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ и 1:3125–1:15 625 в ИФА), тогда как дальнейшее хранение при этих условиях в течение 4 мес сопровождалось снижением титра вируса более чем на $1,0 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ (титр в ИФА – 1:625–1:3125).

Температура -20°C обеспечивала сохранность вируса без снижения инфекционной и иммуногенной активности в течение 6 мес. Титр вирусспецифических антител в сыворотках крови мышей, привитых образцами вакцины, изготовленной из этого материала, имел исходную величину.

При -50°C инфекционная активность вируса в течение 1 года оставалась без изменений, а через 2 года хранения его титр снижался не более чем на $0,7 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$ при сохранении исходной иммуногенной активности. Проверка протективной активности образцов вирусной вакцины показала, что оба материала, хранившиеся в течение 1 и 2 лет, обеспечивали защиту 85–100% привитых мышей после введения вирулентного вируса.

Полученные результаты дают основание утверждать, что штамм «1974-ВНИИВВиМ» вируса ЛДР без снижения инфекционной и иммуногенной активности можно хранить при следующих температурных режимах: 4–6 $^\circ\text{C}$ – 1 мес., -10 – -12°C – 4 мес., -20°C – 6 мес., -50°C – до 2 лет. В последнем случае вирус сохранял до 2 лет и протективные свойства.

Заключение

Изучены инфекционные, иммуногенные и протективные свойства аттенуированного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР в зависимости от уровня пассажей в суспензионной культуре клеток ВНК-21/13 и условий хранения. Результаты свидетельствуют о том, что этот вирус, выращенный в суспензии клеток ВНК-21/13 в течение 20 пассажей, не изменял инфекционные, иммуногенные и протективные свойства. Установлено, что вирус ЛДР при 4–6 и -10 – -12°C сохранял инфекци-

онную активность в течение 2 мес, а иммуногенную – в течение 4 мес. Температура -20°C обеспечивала сохранность вируса без снижения инфекционной и иммуногенной активности в течение 6 мес. Вирус, хранившийся при -50°C в течение 1 и 2 лет, не изменял инфекционных, иммуногенных и протективных свойств.

Полученные данные могут быть использованы при разработке вакцинных и диагностических препаратов из штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР, а также в процессе их производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балышев В.М., Жуков А.Н., Грачев Д.В., Саттаров И.Т., Болгова М.В. *Аттенуированный штамм вируса оспы коз. Патент РФ № 2325437*, 1996.
2. Колян Ф.И. *Разработка и совершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота*: Дисс. ... д-ра вет. наук. Покров; 1998.
3. Колян Ф.И. *Моделирование иммунного ответа и анализ факторов эпизоотического процесса*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Щелково; 2012.
4. Румянцева Е.А., Балышев В.М., Жуков А.Н., Ногина И.В., Сафонов Г.А. *Аттенуированный штамм вируса болезни Найроби. Патент РФ № 2348692*, 2006.
5. Сергеев В.А. *Культивирование и репродукция вирусов животных*. М.: Колос; 1976.

6. Pepin M., Bouloy M., Bird B.H., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyavi ridae : Plebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 61.

REFERENCES

1. Balyshev V.M., Zhukov A.N., Grachev D.V., Sattarov I.T., Bolgova M.V. *The attenuated virus strain Goatpox. Patent RF N 2325437*, 1996. (in Russian)
2. Zakutskiy N.I. *Development and improvement of technology for production of inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis*: Diss. Pokrov; 1998. (in Russian)
3. Kolyan F.I. *Modeling and analysis of immune response factors epizootic process*. Diss. Shchelkovo; 2012. (in Russian)
4. Rumyantseva E.A., Balyshev V.M., Zhukov A.N., Nogina I.V., Safonov G.A. *Attenuating disease virus strain Nairobi; Patent RF N 2348692*, 2006. (in Russian)
5. Sergeev V.A. *Cultivation and reproduction of animal viruses [Kul'tivirovanie i reproduktiya virusov zhivotnykh]*. M.: Kolos; 1976. (in Russian)
6. Pepin M., Bouloy M., Bird B.H., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyavi ridae : Plebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41 (6): 61.

Поступила 19.02.14

Received 19.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 578.842.083.2

Балышева В.И.¹, Прудникова Е.Ю.¹, Гальбек Т.В.², Балышев В.М.¹

Перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K и ее использование в исследованиях с вирусом африканской чумы свиней

¹ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Россельхозакадемии, 601120, г. Покров; ²ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии» Россельхозакадемии, 109428, г. Москва

Получена новая высокочувствительная к вирусу африканской чумы свиней (АЧС) перевиваемая сублиния клеток A₄C₂/9K. Все испытуемые штаммы этого вируса, выделенные в Российской Федерации в 2008 – 2013 гг., размножались в этой культуре клеток с проявлением гемадсорбции (Гад) и накапливались в титре до 6,5 lg ГАЕ₅₀/см³. Культуру клеток A₄C₂/9K можно применять для выделения, определения инфекционной активности и серотиповой принадлежности вируса АЧС. Культуральные варианты штамма Ставрополь 01/08 вируса АЧС 24-го и 33-го пассажей в культуре клеток A₄C₂/9K утратили патогенность для свиней.

Ключевые слова: африканская чума свиней; вирус; культура клеток; гемадсорбция; антитела; вирулентность; иммуногенность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 43–47.

Balysheva V.I.¹, Prudnikova E.Yu.¹, Galnbek T.V.², Balyshev V.M.¹

Continuous cell subline A₄C₂/9K and its application to the african swine fever virus study

¹ National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia, Russian Academy of Agricultural Sciences, 601120, Pokrov, Russia; ² All-Russia Scientific Research Institute for Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia

A new continuous cell subline A₄C₂/9K highly sensitive to the african swine fever virus (ASFV) was prepared. All the tested ASFV strains isolated in the Russian Federation in 2008-2013 proliferated in this cell culture exhibiting hemadsorption and accumulated at a titer of up to 6.5 lg HAU₅₀/cm³. The cell culture A₄C₂/9K can be used for ASFV isolation or determination of its infectious activity and serotype identity. The culture versions of the ASFV strain Stavropol 01/08 at passages 24 and 33 in the cell culture A₄C₂/9K lost their pathogenicity for pigs.

Key words: african swine fever; virus; cell culture; hemadsorption; antibody; virulence; immunogenicity.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 43–47. (In Russ.)

For correspondence: Vera Balysheva, MD, PhD, ScD, Prof.; e-mail: balyvi@rambler.ru

Для корреспонденции: Балышева Вера Ивановна, д-р биол. наук, проф.; e-mail: balyvi@rambler.ru