

БИОЛОГИЯ

УДК: 597.62

DOI 10.33514/1694-7851-2022-4-7-11

Воронина Е.П.

Биологиялык коопсуздук проблемалары боюнча илимий-изилдөө институту
кала Сакчылар, Казакстан
lenavoronina.1982@mail.ru

Абдрахманова Б.С.

доц.

Арабаев атындагы Кыргыз мамлекеттик университети

Нурпейсова А.С.

вет. илим. док., проф.

Аль-Фараби атындагы Казак улуттук университети

Абай Ж.С.

кенже илимий кызматкер

Биологиялык коопсуздук проблемалары боюнча илимий-изилдөө институту
кала Сакчылар, Казакстан

Воронина Е.П.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
Казахстан, пгт. Гвардейский, Казахстан

lenavoronina.1982@mail.ru

Абдрахманова Б.С.

доц.

Кыргызский государственный университет имени И. Арабаева

Нурпейсова А.С.

док. вет. наук, проф.

Казахский национальный университет имени Аль-Фараби

Абай Ж.С.

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
Казахстан, пгт. Гвардейский, Казахстан

Voronina E.P.

Research Institute for Biological Safety Problems
town Guards, Kazakhstan

lenavoronina.1982@mail.ru

Abdrakhmanova B.S.

Associate Professor

Kyrgyz State University named after I. Arabaev

Nurpeisova A.S.

Doctor of Veterinary Sciences, Professor

Al-Farabi Kazakh National University

Abai Zh.S.

Junior Research Assistant

Research Institute for Biological Safety Problems
town Guards, Kazakhstan

**ТУМООНУН РЕКОМБИНАНТТУУ ВИРУСТАРЫН КУЛЬТИВАЦИЯЛОО
ПАРАМЕТРЛЕРИН ОПТИМАЛДАШТЫРУУ**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ВИРУСОВ ГРИППА**

OPTIMIZATION OF CULTIVATION PARAMETERS OF RECOMBINANT INFLUENZA VIRUSES

Аннотация. Бул иш грипптин рекомбинанттык вирусун өстүрүүнүн параметрлерин оптималдаштырууга арналган. Вирустун эффективдүү өсүшүн камсыз кылуучу эң оптималдуу вариантты тандоо ишинде төрт түрдүү культивациялоо ыкмасы каралып чыкты.

Негизги сөздөр: өстүрүү; рекомбинанттык вирус; Vero клеткасынын культуурасы; тумоонун вектору; аш болумдуу чөйрө; вирустун цитопатиялык таасири.

Аннотация. Данная работа посвящена оптимизации параметров культивирования рекомбинантного гриппозного вируса. В работе рассматривались четыре разные методики культивирования для выбора наиболее оптимального варианта, который обеспечивает эффективный рост вируса.

Ключевые слова: культивирования; рекомбинантный вирус; культура клеток Vero; гриппозный вектор; питательная среда; цитопатическое действие вируса.

Annotation. This work is devoted to optimizing the parameters of cultivation of recombinant influenza virus. Four different cultivation methods were considered in the work to select the most optimal variant that provides efficient virus growth.

Keywords: cultivation; recombinant virus; cell culture Vero; influenza vector; nutrient medium; cytopathic effect of the virus.

Введение. Вирусы гриппа птиц являются одним из широко распространенных инфекционных заболеваний человека и животных. В естественных условиях они поражают как различных видов птиц преимущественно водного комплекса, так и млекопитающих. Высокий потенциал вирусов гриппа связан с их быстрой эволюцией, обусловленной наличием сегментированной одно цепочной РНК. Сегментированный геном является основой для реассортации генов при смешанных инфекциях, в ходе которых возникают возможности появления новых вариантов вирусов [1-3]. Острые респираторные вирусные инфекции являются наиболее распространенной группой острых инфекционных заболеваний, возбудители которых проникают в организм через дыхательные пути и репродуцируются преимущественно в клетках слизистых оболочек респираторной системы. Использование рекомбинантных вирусных векторов является одним из наиболее перспективных подходов к созданию вакцин нового поколения против туберкулеза, для производства которого вирусы нарабатываются в разных параметрах [4]. В ветеринарной медицине культуры клеток используют не только для получения противовирусных вакцин, но и для диагностики вирусных инфекций. При этом наиболее важным в этом отношении является создание правильных параметров культивирования вирусов в культуре клеток, что обеспечивает правильность постановки диагноза. Для успешной наработки и выделения вируса необходимо соблюдать следующие требования к культуре клеток. Используемая культура должна быть чувствительной к предполагаемому вирусу, культивирование проводят при определенном соотношении вируса и клеток, так же распределение вируса в монослое при заражении должно быть равномерным. Оптимальная температура для размножения вируса должна быть в пределах допустимой нормы. Работа с культурой клеток требует строгого соблюдения параметров культивирования, абсолютной стерильности, тщательной подготовки посуды и соответствующих питательных сред. Исходя из вышеуказанного, целью данной работы является изучение и выбор оптимального условия культивирования рекомбинантного штамма вируса гриппа птиц в культуре клеток Vero.

Материалы и методы. Объектом исследования являются рекомбинантный штамм вируса гриппа NS_ESAT-6, кодирующий микобактериальный ген.

В работе использовали культуру клеток Vero (Европейская Коллекция Клеточных Культур), адаптированная к росту в питательной без сывороточной среде DMEM, содержащая глюкозу 4,5 г/л и глутамин (CAPRICORN, Германия).

Заражение культуры клеток Vero . В данной работе были выбраны четыре метода культивирования для выбора оптимального одного варианта культивирования рекомбинантного штамма вируса гриппа птиц в культуре клеток Vero.

Метод 1. В культуральный матрас с культурой клеток Vero адаптированную к росту, вносили вирус в количестве 0,5 мл, затем добавляли питательную среду DMEM в количестве 4,5 мл с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1 мл гентамицина. Далее инкубировали в термостате при температуре 34°C в течении трех суток со сменой питательной среды на вторые сутки. Результаты просматривали под малым увеличением микроскопа.

Метод 2. В культуральный матрас с культурой клеток Vero адаптированную к росту, вносили вирус в количестве 0,5 мл, затем добавляли питательную среду DMEM в количестве 4,5 мл с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1 мл гентамицина. Далее инкубировали в термостате при температуре 37°C в течении трех суток со сменой среды, сливая с матраса старую и добавляя свежую среду DMEM в объеме 5 мл. Результаты просматривали под малым увеличением микроскопа.

Метод 3. В культуральный матрас с вентилируемой крышкой с культурой клеток Vero адаптированную к росту, сливали содержимое матраса и промывали три раза питательной без сывороточной среды DMEM с добавлением 1 мл гентамицина, затем вносили вирус в количестве 0,5 мл. Далее инкубировали в CO₂ инкубаторе при температуре 34°C в течении трех суток. Так же делая смену среды сливая с матраса старую и добавляя свежую среду DMEM в объеме 5 мл. Учет результатов вируса просматривают под малым увеличением микроскопа и отмечают активность вируса.

Метод 4. В культуральный матрас с вентилируемой крышкой с культурой клеток Vero адаптированную к росту, сливали содержимое матраса и промывали три раза питательной без сывороточной среды DMEM с добавлением 1 мл гентамицина, затем вносили вирус в объеме 0,5 мл. Далее инкубировали в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C в течении трех суток. Так же делая смену среды сливая с матраса старую и добавляя свежую среду DMEM в объеме 5 мл. Учет результатов вируса просматривают под малым увеличением микроскопа и отмечают активность вируса.

Окончательный учет результатов проводят через четверо суток, после инфицирования культуры клеток [5].

Результаты и обсуждение. По результатам проведенного опыта определения оптимальных параметров, условия культивирования рекомбинантных штаммов вируса гриппа птиц в культуре клеток Vero (Рис.1), было изучено четыре сравнительных метода в которых были указаны разные параметры культивирования культуры клеток, при разных температурах и условиях инкубации.

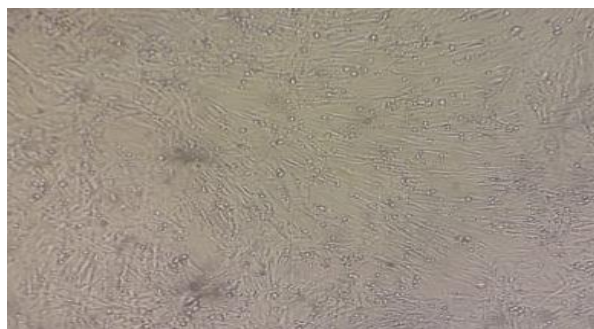


Рисунок 1 – Чистая не зараженная культура клеток Vero с плотным монослоем клеток на первые сутки

По результатам культивирования рекомбинантного штамма в культуре клеток по методу 1, видно, что дно культурального матраса покрыто плотным монослоем, клетки культуры тесно связаны между собой, каких-либо островков не обнаружено в течение всех 3 суток наблюдения (Рис. 2).

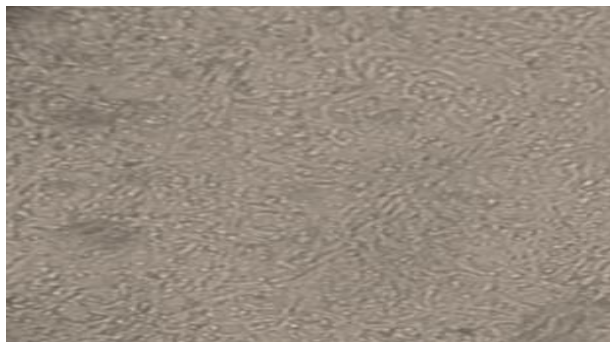


Рисунок 2 – Культивирование рекомбинантного вируса в культуре клеток Vero по методу 1. Через 72 часа ЦПД отсутствует

По результатам работ по культивированию по методу 2, можно обнаружить, что культура клеток Vero не поражена вирусом, в работе использовалась питательная среда DMEM, 10% фетальная бычья сыворотка и культура инкубировалась в термостате при температуре 37°C, ЦПД не проявлялось (Рис. 3).

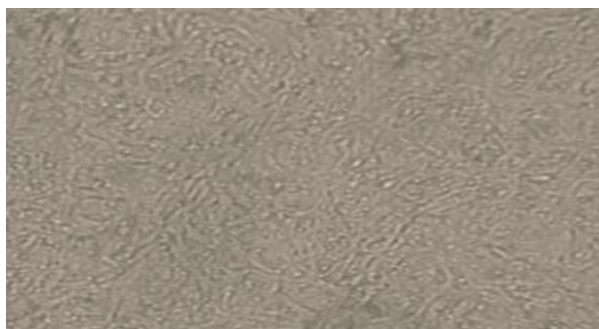


Рисунок 3 – Культивирование рекомбинантного вируса в культуре клеток Vero по методу 2. Через 72 часа ЦПД отсутствует

В результате культивирования рекомбинантного вируса по методу 3, можно обнаружить следующее, культура клеток Vero на 30–40% поражена вирусом, на дне матраса проявились небольшие островки. В этой методике использовалась питательная без сывороточная среда DMEM, содержащая глюкозу 4,5 г/л и глутамин (CAPRICORN, Германия) с трех разовой промывкой культуры клеток содержимого матраса и культура инкубировалась в CO₂ инкубаторе при температуре 34°C в течении трех суток, развитие ЦПД наблюдалось слабо в некоторых местах (рис. 4).

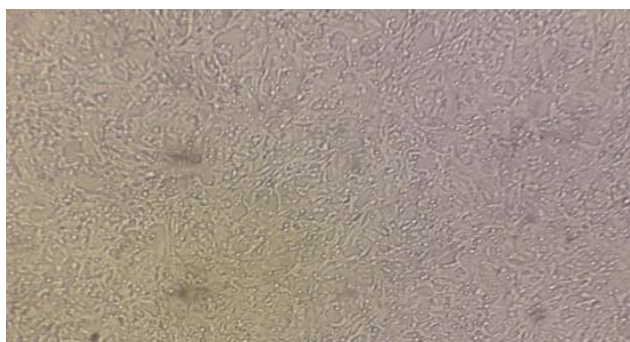


Рисунок 4 – Культивирование рекомбинантного вируса в культуре клеток Vero по методу 3. Слабо развитое ЦПД Через 72 часа после заражения

По результатам работ по культивированию рекомбинантного вируса по методу 4 в культуре клеток Vero, показало наилучший результат, поражая клеточный монослой вирусом на 85–90%. В данной методике использовалась питательная среда DMEM, содержащая глюкозу

4,5 г/л и глутамин (CAPRICORN, Германия) без добавления фетальной сыворотки с трехразовой промывкой той же средой перед заражением культурального матраса, содержащая культуру клеток. матрас был закрыт вентилируемой крышкой и культура инкубировалась в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C. Несмотря на то, что для поражения вирусом клеток в большей степени необходим кислород, другим важнейшим определяющим параметром культивирования является присутствие определенного количества углекислого газа. Оптимальным его содержанием для большинства культур клеток является 5% углекислого газа в течении трех суток. ЦПД полностью присутствовало по всему дну матраса.

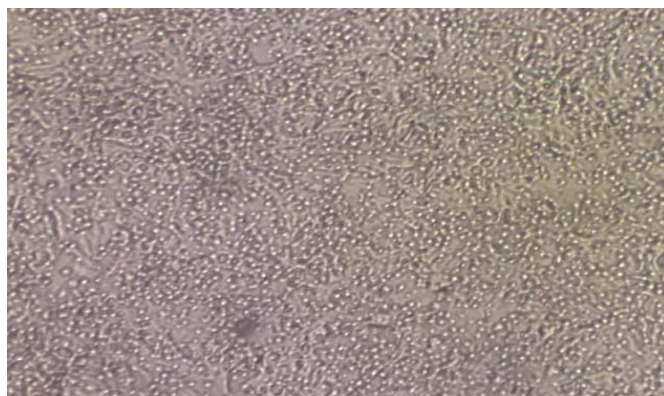


Рисунок 5 – Культивирование рекомбинантного вируса в культуре клеток Vero по методике 4. Видно полностью развитое ЦПД Через 72 часа после заражения

Выводы

В результате проведенных работ были изучены четыре метода культивирования культуры клеток Vero, с рекомбинантным штаммом вируса гриппа. Среди которых оптимальный результат, показала четвертая методика. Параметры культивирования по данному методу является оптимальной средой для эффективного роста вируса. Таким образом установлено, что максимальное поражение монослоя клеток в культуре Vero наступает через 72 часа инкубирования при использовании питательной без сывороточной среды ДМЕМ с трех разовой промывкой этой же питательной средой, при том что матрас был закрыт вентилируемой крышкой и культура инкубировалась в CO₂ инкубаторе при температуре 37° С, с доступом 5% углекислого газа в течении трех суток.

Список использованной литературы:

1. Каверин Н.В., Львов Д.К. Ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae) В книге: Медицинская вирусология. Москва, Медицинское информационное агенство. – 2008. – С. 176–189.
2. Макаров В.В., Воробьев А.А., Боев Б.В. Высокопатогенный грипп птиц и грипп человека // Ветеринарная патология. – 2004. – № 3. – С. 51–59.
3. Высокопатогенный грипп птиц: распространение в Казахстане и разработка средств специфической профилактики. Монография Ж.К. Кыдырбаев, К.К. Табынов, Хайруллин.- Алматы, типография ТОО «Асыл кітап». – 2015. – 356 с.
4. Сергеева М.В., Пулькина А.А., Васильев К.А., Романовская-Романько Е.А., Комиссаров А.Б., Кучур О.А., Егоров А.Ю., Цыбалова Л.М., Стукова М.А. Безопасность и иммуногенность холодаадаптированного гриппозного вектора, экспрессирующего антигены. esat-6 и ag85a m. tuberculosis. вопросы вирусологии. 2017;62(6):266-272. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-266-272>
5. Р.Б. Корочкин, А.А. Вербицкий, В.Н. Алешкин, А.В. Сандул. Культивирование вирусов в культурах клеток. – Витебск: ВГАВМ, 2010. – 22 с.

Рецензент: канд. биолог. наук, доц. Сазыкулова Г.Дж.