

06.02.00 ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

06.02.02 – ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ, ЭПИЗООТОЛОГИЯ, МИКОЛОГИЯ
С МИКОТОКСИКОЛОГИЕЙ И ИММУНОЛОГИЯ (БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ)

УДК 619:578.824.11:57.082.26

DOI 10.18286/1816-4501-2021-3-156-163

РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА “RV-97” В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21/SUSP/ARRIAH И ВНК-21/2-17

Шижков Александр Валерьевич¹, ведущий ветеринарный врач, ORCID 0000-0002-9777-1404

Кулаков Владимир Юрьевич,¹ кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, ORCID 0000-0002-1898-4576

Лозовой Дмитрий Анатольевич², доктор ветеринарных наук, доцент, профессор кафедры «Ветеринарный менеджмент и продовольственная безопасность» ORCID- 0000-0002-5983-7062

¹ ФГБУ «ВНИИЗЖ» Федеральный центр охраны здоровья животных

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская академия кадрового обеспечения агропромышленного комплекса»

¹ 600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, тел. 8(4922) 26-06-14, тел/факс 26-15-73, e-mail: shishkov@arriah.ru

² 111622, г. Москва, ул. Оренбургская, д.15Б тел.+7 (495) 700-0669, e-mail: rako-apk@mail.ru

Ключевые слова: вирус бешенства, штамм RV-97, ВНК-21, суспензионная культура клеток, ВНК-21/SUSP/ARRIAH, инфекционная активность, ККИД₅₀/см³.

Исследование новых суспензионных клеточных линий для культивации вируса бешенства, является актуальным направлением биотехнологии. В научной статье представлены результаты определения чувствительности сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH к вирусу бешенства штамма “RV-97”. Показано сравнение двух перспективных суспензионных клеточных культур ВНК 21 для наработки вирусного материала с высоким титром инфекционной активности [1]. Проведена оценка титров вируса бешенства штамма «RV-97» (lg^*T , ККИД₅₀/см³), установленные через 48 ч культивирования в суспензионных сублиниях клеток ВНК-21 соответственно концентрации клеточной суспензии и множественности заражения. Были испытаны суспензии клеток ВНК-21 с концентрацией: 700 и 1000 (тыс. кл/см³). Множественность заражения составляла 0,01; 0,1 и 0,5 ККИД₅₀/кл. Установлено, что сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAH в концентрации 1млн. кл/см³ имеет преимущества перед сублинией ВНК-21/2-17 и позволяет при множественности заражения 0,1 ККИД₅₀/кл достичь накопления вируса бешенства штамма «RV-97» до 8,25 lg ККИД₅₀/см³. Перечисленные условия считали оптимальными для культивирования данного штамма. Проведен статистический анализ данных для обоснования наименьшего времени культивирования, позволяющего получить наибольший урожай вируса. Определено, что пиковая величина титра, установленная через 48 ч культивирования ($lg^*T_{48}=8,250$), существенно превосходила все предшествующие значения. Однако в последующих образцах ($lg^*T_{58}=7,917$; $lg^*T_{72}=7,833$) достоверных отличий от пиковой оценки показано не было ($p>0.05$).

Введение

Бешенство (rabies, водобоязнь, гидрофобия) – вирусная природно-очаговая инфекционная болезнь с контактным механизмом передачи возбудителя [1, 2].

Борьба с бешенством животных всегда

остается приоритетным направлением в тех государствах, где оно зарегистрировано [4, 5]. Бешенство животных за последние 10 лет (2010-2020гг.) отмечено в более 60 субъектах Российской Федерации (РФ). Наибольшее количество случаев наблюдаются в регионах Центрального,

Приволжского и Северо-Кавказского Федеральных округов [3].

Основную роль в динамику заболеваемости и неблагополучия по бешенству на территории РФ и других стран вносят домашние и дикие плотоядные животные, поэтому вопрос вакцинации является открытым [6, 7].

Для профилактической вакцинации домашних и диких животных рекомендованы к применению на территории РФ вакцины отечественных и зарубежных производителей, зарегистрированные в Государственном реестре. В настоящее время в развитых странах и России продолжается усовершенствование технологии изготовления антирабических вакцин, отвечающих современным требованиям безопасности и эффективности применения [2].

Фиксированные штаммы вируса бешенства легко адаптируются к первичным и परिवиваемым культурам клеток, в которых успешно получен материал с высоким уровнем накопления инфекционной активности для создания антирабических вакцин. Хорошо изученные фиксированные штаммы рекомендуются Всемирной Организацией Здравоохранения (WHO) для применения в составе вакцин в ветеринарной практике [8, 9].

Российскими учеными, сотрудниками «ВГНКИ» и «ВНИИЗЖ» был получен путем адаптации в монослойной культуре клеток ВНК-21 модифицированный штамм вируса бешенства «RV-97» [10]. Данный штамм происходит из штамма «Москва» → «Овечий-ВГНКИ» → «РБ-71» (БелНИИЭВ-ВГНКИ) → «RV-97» [2]. Изучено, что штамм бешенства «RV-97» обладает высокой инфекционной активностью при культивировании в суспензионной культуре клеток ВНК-21, который успешно применяется более 20 лет при изготовлении оральной антирабической вакцины для плотоядных животных. Вакцинный штамм бешенства «RV-97» является основой в препаратах отечественного производства: «Оралрабивак», «Синраб», «Рабистав» [3, 11].

Группе ученых ФГБУ «ВНИИЗЖ» удалось применить сублинию клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAN в производственных процессах получения вирусного материала, которая была получена путем перманентного культивирования в суспензии сублинии клеток ВНК-21/2-17 на протяжении 30 лет, а также подбором ростовой среды оригинального состава [1, 12, 13].

В связи с вышеизложенным целью данной работы было определение чувствительности сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN к вирусу бешен-

ства штамма «RV-97» и сравнительное изучение двух суспензионных клеточных культур ВНК - 21 для наработки вирусного материала с высоким титром инфекционной активности.

Материалы и методы исследований

В эксперименте использовали культуральный вирус бешенства «RV-97» 6-го пассажа на монослойной культуре клеток ВНК-21 (шведская линия), две суспензионные сублинии культуры клеток ВНК-21: ВНК-21/2-17 (I) и ВНК-21/SUSP/ARRIAN (II). Культивирование вируса проводили в биологических реакторах КС-40, КС-250. Были испытаны концентрации суспензий (тыс. кл/см³): 700 и 1000. Множественность заражения составляла: 0,01, 0,1 и 0,5 ККИД₅₀/кл. Для достижения заданной множественности необходимый объем ($V_{\text{вир}}, \text{см}^3$) вносимой расплодки вируса на 1 л клеточной суспензии (1000 см³) вычисляли по следующей формуле: $\lg V_{\text{вир}} = [(\lg C_{\text{кл/мл}} + 3,0) + \lg D] - \lg T'$,

где $C_{\text{кл/см}^3}$ – концентрация клеток в суспензии; 3,0 = $\lg 1000 \text{ см}^3$ (принятый для проведения расчёта объем клеточной суспензии); D – множественность заражения ККИД₅₀/клетка; T' – титр вируса в материале заражения (расплодке), ККИД₅₀/см³.

Продолжительность культивирования определяли на основании показателя жизнеспособности клеток. Проводили периодический микроскопический контроль проб суспензии. Оценивали целостность клеточной стенки по проникновению раствора метиленового синего. Процесс культивирования прекращали, если при просмотре в камере Горяева 25% и более клеток были окрашены, т.е. имели нарушенную целостность клеточной стенки. Установили лимит на максимальное время экспериментального культивирования, которое не должно превышать 48 ч, после чего в пробах вирусосодержащей клеточной суспензии определяли титр.

В качестве тест-системы для определения инфекционной активности вируса использовали чувствительную культуру клеток ВНК-21, выращенную в виде монослоя в лунках плоскодонных пластиковых планшетов. Для индикации инфицированных клеток использовали ФИТЦ иммуноглобулин производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Соответственно испытанным разведениям вирусного материала регистрировали наличие фокусов флюоресценции. Расчет логарифмической величины титра ($\lg T$) вируса определяли по формуле Спирмена-Кербера и выражали в единицах ККИД₅₀/см³ [8, 14].

При статистической обработке данных ис-

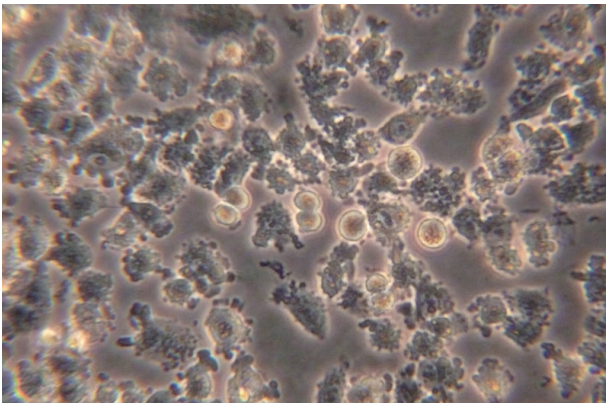


Рис.1 - Морфология суспензионной клеточной линии ВНК-21/2-17 интактная, 1 пассаж, 24 часа. Электронный микроскоп (увеличение $\times 400$).

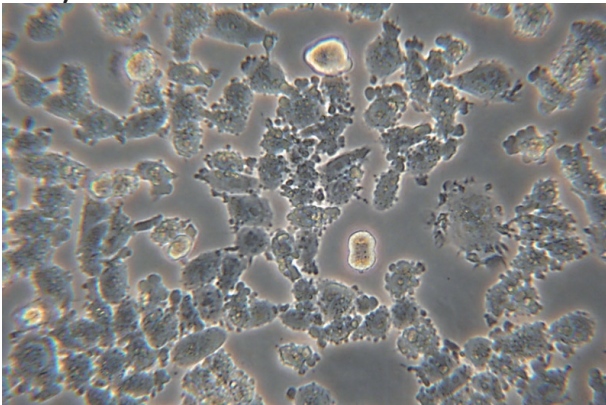


Рис. 2 - Морфология суспензионной клеточной линии ВНК-21/SUSP/ARRIAN интактная, 5 пассаж, 24 часа. Электронный микроскоп (увеличение $\times 400$).

пользовали стандартные методы обработки выборок варьирующих переменных. Определяли существенность различий средних величин. С этой целью использовали метод множественных сравнений Шеффе [15]. Различия считали статистически достоверными на уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

Перевиваемая клеточная сублиния ВНК-21/2-17 более 30 лет культивировалась в суспензионных условиях без монослойной стадии и была подвержена около 100 последовательным пассажам в ростовой среде MEM модифицированного состава на основе раствора Хенкса [16]. В результате была получена новая суспензионная клеточная сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAN с некоторыми кариологическими изменениями. Модальный класс новой сублинии стал равен 41 хромосоме и соответствует 32-40% популяции. Доля клеток с количеством хромосом 40-42 со-

ставляет 78-80%, полиплоидов – в среднем около 1% [1].

Результаты культивирования аттенуированного вакцинного штамма «RV-97» вируса бешенства в суспензионной сублинии клеток ВНК-21, полученные согласно заданным условиям культивирования, представлены в таблице 1.

Данные, приведенные в таблице 1, наглядно демонстрируют, что величина инфекционного титра, характеризующая накопления вируса в течение фиксированного времени, зависела от заданных условий. При этом было отмечено влияние всех контролируемых параметров (вида сублинии клеток, концентрации клеточной суспензии и множественности заражения).

Считали, что наиболее важным параметром, влияющим на процесс, является множественность заражения. На этом основании применили статистический анализ, позволяющий определить существенность различий полученных величин титров. Провели последовательное парное сопоставление всех полученных оценок титров в неповторяющихся комбинациях для каждой испытанной заражающей дозы обеих сублиний и концентраций клеточной суспензии. Полученные результаты анализа представлены в таблице 2.

Результаты, приведенные в таблице 2, показали, что при множественности заражения 0,01 ККИД₅₀/кл существенных различий ($p=0,05$) между результирующими оценками установлено не было. При этом заражение 0,1 ККИД₅₀/кл обусловило значимое различие в накоплении вируса в сублинии II, где средние логарифмические оценки титров (8,13 и 8,25 lg ККИД₅₀/см³) существенно ($p < 0,05$) превосходили аналогичные величины в сублинии I (7,03 и 7,15 lg ККИД₅₀/см³). Увеличение заражающей дозы 0,5 ККИД₅₀/кл оказало меньшее влияние на урожай вируса. Однако и в этом случае сублиния II в концентрации 1000 тыс. кл/см³ показала достоверно ($p < 0,05$) более высокий титр ($7,96 \pm 0,19$ lg ККИД₅₀/см³).

Исследовали динамику накопления вируса бешенства штамма «RV-97» при установленных оптимальных условиях суспензионного культивирования. Через заданные интервалы времени из инфицированной клеточной суспензии отбирали пробы и определяли титр инфекционного вируса. Полученные результаты в виде диаграммы представлены на рисунке 3.

Таблица 1

Средние логарифмические оценки титров вируса бешенства штамма «RV-97» ($\lg'T$, ККИД₅₀/см³), установленные через 48 ч культивирования в суспензионных сублиниях клеток ВНК-21 соответственно концентрации клеточной суспензии и множественности заражения

Суспензионная сублиния ВНК-21	Концентрация клеточной суспензии, тыс кл/см ³	Множественность заражения (ККИД ₅₀ /клетка)		
		0,01	0,1	0,5
ВНК-21/2-17 (I)	700	6,73±0,19*	7,03±0,21	7,25±0,12
	1000	7,05±0,24	7,15±0,12	6,75±0,18
ВНК-21/SUSP/ARRIAH (II)	700	7,56±0,19	8,13±0,21	7,33±0,26
	1000	7,43±0,21	8,25±0,15	7,96±0,19

Примечания:
* - дана стандартная ошибка измерения среднего титра инфекционной активности (при n=3)

Таблица 2

Результаты сопоставления средних логарифмических значений инфекционных титров вируса бешенства штамма «RV-97» ($\lg'T$, ККИД₅₀/см³), установленных в суспензионных сублиниях клеток ВНК-21 соответственно испытанным концентрациям клеток и множественности заражения

Концентрация клеток сублинии, тыс кл/см ³	Статистические коэффициенты (F)* для данной пары сопоставляемых значений $\lg'T$				
	$\lg'T$	Множественность заражения 0,01 ККИД ₅₀ /кл			
		$\lg'T$			
		6,73	7,05	7,56	7,43
700 (I)**	6,73 (0,2166; 3)***	-	-	-	-
1000 (I)	7,05 (0,3456; 3)	0,52	-	-	-
700 (II)	7,56 (0,2166; 3)	3,52	1,33	-	-
1000 (II)	7,43 (0,2646; 3)	2,50	0,74	0,09	-
		Множественность заражения 0,1 ККИД ₅₀ /кл			
	$\lg'T$	$\lg'T$			
		7,03	7,15	8,13	8,25
700 (I)**	7,03 (0,2646; 3)	-	-	-	-
1000 (I)	7,15 (0,0864; 3)	0,10	-	-	-
700 (II)	8,13 (0,2646; 3)	8,60#	6,82	-	-
1000 (II)	8,25 (0,135; 3)	10,58	8,60	0,10	-
		Множественность заражения 0,5 ККИД ₅₀ /кл			
	$\lg'T$	$\lg'T$			
		7,25	6,75	7,33	7,96
700 (I)	7,25 (0,0864; 3)	-	-	-	-
1000 (I)	6,75 (0,1944; 3)	1,48	-	-	-
700 (II)	7,33 (0,4056; 3)	0,04	1,99	-	-
1000 (II)	7,96 (0,2166; 3)	2,98	8,65	2,34	-

Примечания:
* - $F_{1,2} = (\lg'T_1 - \lg'T_2)^2 / (D/n_1 + D/n_2)$, где: $D = ((\sum Q) \times (k-1)) / (\sum n - k)$; Q – сумма квадратов отклонений выборки; n – число элементов в выборке; k – число выборок;
** - в скобках указана суспензионная сублиния: I - ВНК-21/2-17b, II - ВНК-21/SUSP/ARRIAH;
*** - в скобках указана значение Q и объем выборки (n);
**** - цветом выделены ячейки с коэффициентами, для которых выполняется неравенство $F \geq F_{p=0,05} = 4,07$, где F_p – критерий Фишера соответственно заданного уровня p для $v_1 = k-1$ и $v_2 = \sum n - k$

Представленная на рисунке 3 диаграмма иллюстрирует процесс репродукции вируса в клеточной суспензии. Установленный в пробах клеточной суспензии после 10-го часа культивирования средний титр инфекционного вируса ($\lg'T_{10} = 4,917$) монотонно возрастал по экспоненте. Пик накопления вируса наблюдали через 48 часов от начала процесса ($\lg'T_{48} = 8,250$). Даль-

нейшее увеличение времени культивирования не привело к возрастанию титра. В интервале 48 – 72 часа средние значения титра инфекционного вируса относительно пиковой величины явно уменьшались ($\lg'T_{58} = 7,917$; $\lg'T_{72} = 7,833$).

Провели статистический анализ данных для обоснования наименьшего времени культивирования, позволяющего получить наиболь-

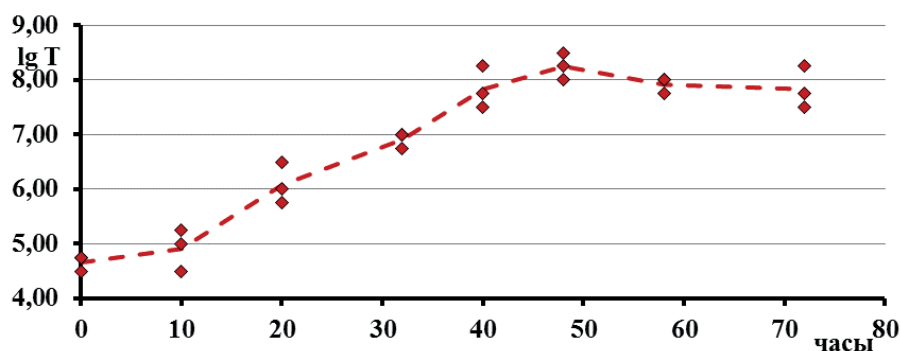


Рис. 3 - Оценки титров инфекционного вируса бешенства штамма «RV-97» (◆ - T, ККИД₅₀/см³), установленные в суспензии клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN, в концентрации 1млн. кл/см³ при множественности заражения 0,1 ККИД₅₀/клетка в зависимости от времени культивирования. Пунктиром показана средняя тенденция.

Таблица 3

Результаты сопоставления средних логарифмических значений инфекционных титров (lg 'T, ККИД₅₀/см³) вируса бешенства штамма «RV-97» уставленных в суспензии клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN в зависимости от времени культивирования (Ч, часы)

Статистические коэффициенты (F)* для данной пары сопоставляемых значений lg 'T									
Ч	lg 'T(Q; n)	lg 'T							
		4,667	4,917	6,083	6,917	7,833	8,25	7,917	7,833
0	4,667 (0,042; 3)	-	-	-	-	-	-	-	-
10	4,917 (0,292; 3)	0,15	-	-	-	-	-	-	-
20	6,083 (0,292; 3)	4,85	3,29	-	-	-	-	-	-
32	6,917(0,042; 3)	12,25	9,68	1,68	-	-	-	-	-
40	7,833 (0,292; 3)	24,26	20,58	7,41	2,03	-	-	-	-
48	8,250 (0,125; 3)	31,07	26,89	11,36	4,30	0,42	-	-	-
58	7,917 (0,042; 3)	25,56	21,78	8,14	2,42	0,02	0,27	-	-
72	7,833 (0,292; 3)	24,26	20,58	7,41	2,03	0,00	0,42	0,017	-

Примечания:
 * - $F_{1,2} = (lg'T_1 - lg'T_2)^2 / (D/n_1 + D/n_2)$, где: $D = ((\sum Q) \times (k-1)) / (\sum n - k)$; Q – сумма квадратов отклонений выборки; n – число элементов в выборке; k – число выборок;
 ** - цветом выделены ячейки с коэффициентами, для которых выполняется неравенство $F \geq F_{p=0,05} = 2,66$, где F_p – критериальный коэффициент Фишера соответственно заданного уровня p для $v_1 = k-1$ и $v_2 = \sum n - k$.

ший урожай вируса. С этой целью выполнили последовательное парное сопоставление всех полученных оценок титров в неповторяющихся комбинациях с учетом неопределенности их измерений. Результаты сопоставления представлены в таблице 3.

Из данных таблицы 3 следует, что прирост урожая вируса после 10 часов культивирования, установленный на всех последующих интервалах времени, был статистически достоверным ($p < 0,05$). При этом пиковая величина титра, установленная через 48 ч культивирования ($lg'T_{48} = 8,250$), существенно превосходила все

предшествующие значения. Однако в последующих образцах ($lg'T_{58} = 7,917$; $lg'T_{72} = 7,833$) достоверных отличий от пиковой оценки показано не было ($p > 0,05$).

Обсуждение

Подбор клеточных систем для выращивания вирусов и других патогенов в промышленных условиях-одна из практических задач, решение которых позволит повысить эффективность биопрепаратов [7]. Процессы производства вакцин на основе суспензионных клеточных культур позволяют выполнять простые этапы инфицирования и сбора урожая в опре-

деленных средах с закрытыми биореакторными системами, обеспечивающими стерильность при дальнейшем снижении рисков биобезопасности путем автоматизации [18].

В результате проведенных исследований было установлено, что при культивировании вируса бешенства штамма «RV-97» в суспензии клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH, имеющей концентрацию 1000 тыс кл/см³, при множественности заражения 0,1 ККИД₅₀/кл оптимальная продолжительность процесса составляет 48 часов. Через установленный интервал времени ожидаемая средняя концентрация инфекционного вируса в клеточной суспензии с указанием расширенной статистической неопределенности ($t_{p=0,05}=4,30$) должна составить величину $(8,25 \pm 0,62)$ lg ККИД₅₀/см³.

Результаты сравнительного изучения суспензионных сублиний ВНК-21 показали, что при множественности заражения 0,01 ККИД₅₀/кл существенных различий ($p=0,05$) между результирующими оценками установлено не было. Увеличение заражающей дозы 0,5 ККИД₅₀/кл оказало меньшее влияние на урожай вируса. Однако и в этом случае сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAH в концентрации 1млн кл/см³ показала достоверно ($p<0,05$) более высокий титр $7,96 \pm 0,19$ lg ККИД₅₀/см³. При заражении 0,1 ККИД₅₀/кл обусловило значимое различие в накоплении вируса в сублинии II, где средние логарифмические оценки титров 8,13 и 8,25 lg ККИД₅₀/см³ существенно ($p<0,05$) превосходили аналогичные величины в сублинии I (7,03 и 7,15 lg ККИД₅₀/см³).

Заключение

Сублиния клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH может быть успешно применена для культивирования вируса бешенства штамма «RV-97», для изготовления средств специфической профилактики бешенства.

Получен вирус бешенства штамма “RV-97”, адаптированный к суспензионной линии культуры клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH, который в суспензии с концентрацией 1,0 млн. кл/см³ и множественности заражения 0,1 ККИД₅₀/кл способен в течение 48 часов культивирования иметь среднее накопление $8,25 \pm 0,62$ lg ККИД₅₀/см³.

Библиографический список

1. Патент 2722671 Российская Федерация, МПК C12N 5/10 (2006.01). ВНК-21/SUSP/ARRIAH - перевиваемая суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3, болезни Ауе-

ски при производстве противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов ФГБУ «ВНИИЗЖ»: № 2019131190 : заявл. 01.10.2019 : опубл. 02.06.2020 / Лозовой Д. А., Гусева М. Н., Михалишин Д. В. [и др.]. - Бюл. № 16. - Введ. с 01.10.2019 по 01.10.2039

2. Груздев, К. Н. Бешенство животных / К. Н. Груздев, А. Е. Метлин. – Владимир : ФГБУ ВНИИЗЖ, 2019. – 394 с. – ISBN 978-5-900026-73-2.

3. Гусев, А. А. Региональные программы по борьбе с бешенством плотоядных животных, в том числе бродячих собак, с помощью блистер-приманок / А. А. Гусев, В. М. Авилов, В. А. Бабак // Ветеринария Кубани. – 2019. – № 4. – С. 18-22.

4. Опыт мероприятий по предупреждению заноса и распространения бешенства на длительно благополучной территории (по материалам Иркутской области) / И. В. Мельцов, А. М. Аблов, Е. Н. Школьников [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2020. – № 3(34). – С. 154-161.

5. Nandi, S. Global perspective of rabies and rabies related viruses: a comprehensive review / S. Nandi, M. Kumar // Asian J. Anim. Vet. Adv. – 2011. – Vol. 6. – P. 101-116.

6. Бельчихина, А. В. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации / А. В. Бельчихина, А. К. Караулов // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1(16). – С. 64-70.

7. Molecular epidemiology of rabies viruses in Europe / L. M. McElhinney, D. Marston, N. Johnson [et al.] // Dev. Biol. (Basel). – 2006. – Vol. 125. – P. 17-28.

8. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) . Chapter 3.1.17. – Rabies (infection with rabies virus) and other lyssaviruses. – Paris, 2018. – P. 1-35.

9. Molecular and immunogenic characterization of ВНК-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy / С. А. Patel, V. Upmanyu, S. Ramasamy [et al.] // Virusdisease. – 2015. – Vol. 26, № 4. – P. 288-296.

10. Genetic characterization of Russian field and vaccine rabies virus strains / А. Е. Metlin, Е. Neuvonen, S. S. Rybakov [et al.] // 4th Intern. Vet. Vaccines and Diagn. Conf.: Progr. and Abstr. – Oslo, 2006. – P. 76.

11. Доронин, М. И. Сравнительный анализ биологических свойств штамма «ВНИИЗЖ» с производственными штаммами вируса бешен-

ства генетической линии RABV / М. И. Доронин, В. А. Стариков, Д. В. Михалишин // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии : сборник тезисов докладов 20-й Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва, 2020. – С. 62-63.

12. Гусева, М. Н. Использование специализированных добавок Sheff-Vax ACF для культивирования клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH и репродукции вируса / М. Н. Гусева, М. И. Доронин, А. А. Шишкова // Ветеринария сегодня. – 2021. – № 1(36). – С. 15-21.

13. Применение полиэтиленгликоля и Pluronic F-68 в качестве компонента бессывороточной среды для культивирования клеток линии ВНК-21/SUSP/ARRIAH / М. Н. Гусева, М. И. Доронин, Д. В. Михалишин [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2020. – № 3(47). – С. 28-33.

14. Методические рекомендации по анализу параметров в системах «доза-эффект» с альтернативным способом оценивания / В. Ю. Кулаков, С. Н. Колосов, А. В. Константинов [и др.]. – Владимир : ФГБУ ВНИИЗЖ, 2016. – 31 с.

15. Поллард, Д. Справочник по вычислительным методам статистики / Д. Поллард. – Москва : Финансы и статистика, 1982. – 344 с.

16. Оптимизация состава питательных сред для культивирования суспензии клеток ВНК-21/2-17 / М. Н. Гусева, Д. В. Михалишин, А. А. Шишкова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 4. – С. 35-39.

17. Дьяконов, Л. П. Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействия клеток с инфекционными патогенами / Л. П. Дьяконов // Цитология. – 1994. – № 6. – С. 503-504.

18. Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production / L. E. Gallo-Ramírez, A. Nikolay, Y. Genzel, U. Reichl // Expert Review of Vaccines. – 2015. – Vol. 14. – P. 1181-1195.

REPRODUCTION OF THE RABIES VIRUS OF “RV-97” STRAIN IN THE SUSPENSION CULTURE OF VNK-21 / SUSP / ARRIAH AND VNK -21 / 2-17 CELLS

Shishkov A.V.¹, Kulakov V.Yu.¹, Lozovoy D.A.²

¹FSBI “ARRIAH” Federal Center for Animal Health

²Federal State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education “Russian Academy of Human Resourcing for the Agroindustrial Complex”

1600901, Vladimir, Yuryevets md., tel. 8 (4922) 26-06-14, tel / fax 26-15-73, e-mail: shishkov@arriah.ru
2111622, Moscow, Orenburgskaya st., 15B tel. +7 (495) 700-0669, e-mail: rako-apk@mail.ru

Key words: rabies virus, RV-97 strain, VNK -21, suspension cell culture, VNK -21 / SUSP / ARRIAH, infectious activity, KKID50 / cm³.

The study of new suspension cell lines for rabies virus cultivation is a topical area of biotechnology. The article presents results of specification of sensitivity of VNK-21 / SUSP / ARRIAH subline to the rabies virus of “RV-97” strain. A comparison of two highly potential suspension cell cultures of VNK 21 for production of viral material with a high titer of infectious activity is shown [1]. The estimation of the titers of the rabies virus of “RV-97” strain (lg T, CCID 50 / cm³) was carried out, the titers were established after 48 hours of cultivation in the suspension subline of VNK -21 cells, according to the cell suspension concentration and the multiplicity of infection. Suspensions of VNK-21 cells with concentrations of 700 and 1000 (thousand cells / cm³) were tested. The multiplicity of infection was 0.01; 0.1 and 0.5 CCID 50 / cell. It was found that VNK-21 / SUSP / ARRIAH subline at a concentration of 1 mln. cells / cm³ has advantages over VNK-21 / 2-17 subline and allows, at a multiplicity of infection of 0.1 CCID 50 / cell, to achieve the accumulation of the rabies virus of “RV-97” strain up to 8.25 lg CCID 50 / cm³. The listed conditions were considered suitable for cultivation of this strain. Statistical analysis of the data for substantiation of the shortest cultivation time, which allows to obtain the largest virus yield was carried out. It was determined that the peak titer value, established after 48 hours of cultivation (lg T₄₈ = 8.250), significantly exceeded all previous values. However, there were no significant differences from the peak estimate (p > 0.05) in subsequent samples (lg T₅₈ = 7.917; lg T₇₂ = 7.833).

Bibliography:

1. Patent 2722671 Russian Federation, IPC C12N 5/10 (2006.01). VNK-21 / SUSP / ARRIAH - transplantable suspension subline of kidney cells of a newborn Syrian hamster, designed for virus reproduction of FMD, rabies, parainfluenza-3, Aujeszky's disease in production of antiviral vaccines, as well as for the production of diagnostic and prophylactic veterinary biological products FSBI ARRIAH: № 2019131190: Appl. 01.10.2019: publ. 02.06.2020 / Lozovoy D. A., Guseva M. N., Mikhailishin D. V. [and others]. - Bul. № 16. – Introd. from 01.10.2019 to 01.10.2039
2. Gruzdev, K.N. Animal rabies / K.N. Gruzdev, A.E. Metlin. - Vladimir: FSBI ARRIAH, 2019. - 394 p. - ISBN 978-5-900026-73-2.
3. Gusev, A. A. Regional programs to combat rabies of carnivores, including stray dogs, using blister-baits / A. A. Gusev, V. M. Avilov, V. A. Babak // Veterinary of Kuban. - 2019. - № 4. - P. 18-22.
4. Experience of measures on prevention of introduction and spread of rabies in a long-term safe territory (based on materials from Irkutsk region) / I.V. Meltsov, A.M. Ablav, E.N. Shkolnikova [and others] // Veterinary medicine today. - 2020. - № 3 (34). - P. 154-161.
5. Nandi, S. Global perspective of rabies and rabies related viruses: a comprehensive review / S. Nandi, M. Kumar // Asian J. Anim. Vet. Adv. - 2011. - Vol. 6. - P. 101-116.
6. Belchikhina, A. V. Retrospective analysis of epizootic situation of animal rabies on the territory of the Russian Federation / A. V. Belchikhina, A. K. Karaulov // Veterinary medicine today. - 2016. - № 1 (16). - P. 64-70.
7. Molecular epidemiology of rabies viruses in Europe / L. M. McElhinney, D. Marston, N. Johnson [et al.] // Dev. Biol. (Basel). - 2006. - Vol. 125. - P. 17-28.
8. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 3.1.17. - Rabies (infection with rabies virus) and other lyssaviruses. - Paris, 2018. - P. 1-35.
9. Molecular and immunogenic characterization of BHK-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy / C. A. Patel, V. Upmanyu, S. Ramasamy [et al.] // Virusdisease. - 2015. - Vol. 26, № 4. - P. 288-296.

10. Genetic characterization of Russian field and vaccine rabies virus strains / A. E. Metlin, E. Neuvonen, S. S. Rybakov [et al.] // 4th Intern. Vet. Vaccines and Diagn. Conf.: Progr. and Abstr. - Oslo, 2006. - P. 76.
11. Doronin, M.I. Comparative analysis of biological properties of "ARRIAH" strain with industrial strains of rabies virus of RABV genetic line / M.I. Doronin, V.A. Starikov, D.V. Mikhailishin // *Biotechnology in crop production, animal husbandry and agricultural microbiology: a collection of abstracts of the 20th All-Russian conference of young scientists dedicated to the memory of the academician of the Russian Academy of Agricultural Sciences Georgy Sergeevich Muromtsev*. - Moscow, 2020. - P. 62-63.
12. Guseva, M.N. Usage of Sheff-Vax ACF specialized additives for cultivation of VNK-21 / SUSP / ARRIAH cells and virus reproduction / M.N. Guseva, M.I. Doronin, A.A. Shishkova // *Veterinary Medicine Today*. - 2021. - № 1 (36). - P. 15-21.
13. The use of polyethylene glycol and Pluronic F-68 as a component of a serum-free medium for cultivation of VNK-21 / SUSP / ARRIAH cells / M.N. Guseva, M.I. Doronin, D.V. Mikhailishin [et al.] // *Current issues of veterinary biology*. - 2020. - № 3 (47). - P. 28-33.
14. Methodical recommendations for analysis of parameters in "dose-effect" systems with an alternative assessment method / V. Yu. Kulakov, S. N. Kolosov, A. V. Konstantinov [and others]. - Vladimir: FSBI ARRIAH, 2016. - 31 p.
15. Pollard, D. Handbook of statistics computational methods / D. Pollard. - Moscow: Finance and Statistics, 1982. - 344 p.
16. Improvement of nutrient media composition for cultivation of cell suspension VNK-21 / 2-17 / M.N. Guseva, D.V. Mikhailishin, A.A. Shishkova [et al.] // *Veterinary science today*. - 2016. - № 4. - P. 35-39.
17. Dyakonov, L.P. Animal cell cultures: modern aspects of biotechnology and interaction of cells with infectious pathogens / L.P. Dyakonov // *Cytology*. - 1994. - № 6. - P. 503-504.
18. Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production / L. E. Gallo – Ramírez, A. Nikolay, Y. Genzel, U. Reichl // *Expert Review of Vaccines*. - 2015. - Vol. 14. - P. 1181-1195.